

**TIEFGEFRIERKONSERVIERUNG
BEFRUCHTETER MÄUSEEIZELLEN**

Axel Kuhn

1975

Aus der Abteilung für Andrologie und Künstliche Besamung
an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. W. L e i d l

T I E F G E F R I E R K O N S E R V I E R U N G
B E F R U C H T E T E R M Ä U S E E I Z E L L E N

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-
Universität München

von

Axel Kuhn

aus Remscheid

München 1974

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus

Referent: Prof. Dr. W. Leidl

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. I. Rüsse

Tag der Promotion: 21. Februar 1975



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literatur	2
2.1. Konservierung von Säugereizellen bei niedrigen Temperaturen	2
2.1.1. Grundlegende Arbeiten	2
2.1.2. Die Tiefgefrierkonservierung be- fruchteter Mäuseeizellen	3
2.1.3. Tiefgefrierkonservierung befruch- teter Rindereizellen	7
2.2. In-Vitro-Kultivierung von Mäuseeizellen	7
2.2.1. Superovulation und Eigewinnung	7
2.2.2. Kulturmedien und ihre Zusammen- setzung	9
2.2.3. Methoden zur Aufbewahrung von Eizellen	12
2.2.4. Entwicklung der Eizellen	13
2.3. Der Einfluß niedriger Temperaturen auf die lebende Zelle	17
2.3.1. Temperaturschock und Eizelle	18
2.3.2. Chemisch-physikalische Vorgänge innerhalb und außerhalb der Ei- zelle	19
2.3.3. Gefrierschutzsubstanzen und ihre Wirkungen	23
2.4. Transplantation von Mäuseeizellen	27
2.4.1. Grundvoraussetzungen	27
2.4.2. Methoden der Übertragung	30
2.4.2.1. Unblutig	30
2.4.2.2. Blutig	31
2.5. Einfluß niedriger Temperaturen auf die genetische Substanz der Zelle	37

2.6. Chromosomen und ihre Darstellung	39
2.7. Chromosomenanalyse an befruchteten Mäuse- und Schweineeizellen	40
3. Eigene Untersuchungen	42
3.1. Material und Methode	42
3.1.1. Kulturmedien und deren Vorbereitung	42
3.1.2. Superovulation und Eigewinnung	45
3.1.2.1. Versuchstiere und deren Vorbereitung	45
3.1.2.2. Methoden zur Eigewinnung	46
3.1.3. In-vitro-Kultivierung	50
3.1.4. Tiefgefrierkonservierung	51
3.1.4.1. Methode I (modifiziert nach WHITTINGHAM, 1971a)	51
3.1.4.1.1. Material und Geräte	52
3.1.4.1.2. Versuchsablauf	52
3.1.4.2. Methode II	53
3.1.4.3. Methode III (modifiziert nach WHITTINGHAM und Mit- arbeitern, 1972)	54
3.1.4.3.1. Material und Geräte	54
3.1.4.3.2. Versuchsablauf	56
3.1.5. Rücktransplantation (modifiziert nach MCLAREN und MICHIE, 1956)	58
3.1.5.1. Vasektomie der Böcke	58
3.1.5.2. Spendereizelle und Empfänger- tiere	59
3.1.5.3. Eizellübertragung und Gravi- ditätskontrolle	60

3.1.6. Chromosomenanalyse an Mäuse- blastozysten (modifiziert nach TARKOWSKI, 1966 und MCFEELY, 1966)	62
3.1.6.1. Anfertigung der Präparate	62
3.1.6.2. Auswertung der Mitosen	64
3.2. Ergebnisse	64
3.2.1. Methode I	64
3.2.2. Methode II	65
3.2.3. Methode III	68
3.2.4. Rücktransplantation	72
3.2.5. Chromosomenanalyse	74
4. Diskussion	78
5. Zusammenfassung	92
6. Literaturverzeichnis	95
Lebenslauf	113

1. Einleitung

Die Tiefgefrierkonservierung von Rinderspermien ist seit 20 Jahren ein weltweites Routineverfahren.

Die Konservierung mehrzelliger Systeme, wie jüngste Entwicklungsstadien von Säugern, die in ihrer genetischen Information im Gegensatz zu Spermien vollständig sind, war jedoch mit großen Schwierigkeiten verbunden.

Erst seit 1971 ist es möglich, befruchtete Mäuseeizellen bei Temperaturen weit unter dem Gefrierpunkt aufzubewahren. Die dabei entstehenden Schäden sind relativ gering (WHITTINGHAM, 1971a).

In jüngster Zeit gelang es erstmals, 10 bis 13 Tage alte Rinderblastozysten, die bei tiefen Temperaturen gelagert worden waren, mit Erfolg auf Empfängertiere zu übertragen (WILMUT und ROWSON, 1973).

Aussagen über die Reproduzierbarkeit dieses Verfahrens liegen bis heute nicht vor.

Da offenbar bis zu befriedigenden Lösung dieses Problems noch vielfältige Schwierigkeiten zu überwinden sind, erscheint es sinnvoll, Einzelfragen zunächst am Modell der Maus zu klären.

Gegenstand dieser Arbeit ist es, hohe Überlebensraten in Abhängigkeit vom Entwicklungsstadium befruchteter Mäuseeizellen zu erzielen.

In diesem Zusammenhang sollten einmal reproduzierbare Erfolge mit vereinfachter und gleichzeitig wirkungsvoller Kultivierungstechnik bzw. einem unkomplizierten Tiefgefrierverfahren erreicht werden. Zum anderen boten sich die Sturzkühlmethode von WHITTINGHAM (1971a) und Aussagen über die Notwendigkeit extrem langsamer Abkühlung zur Überprüfung an. Nicht zuletzt aber war die Frage nach dem möglichen Einfluß tiefer Temperaturen auf die Morphologie der genetischen Substanz gestellt.

2. Literatur

2.1. Konservierung von Säugereizellen bei niedrigen Temperaturen

2.1.1. Grundlegende Arbeiten

Systematische Untersuchungen über die Konservierungseignung befruchteter Säugereizellen begannen im Jahre 1947. Kanincheneier im 2-Zell-Stadium wurden wenige Tage bei 0°C , $+5^{\circ}\text{C}$ und $+10^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die Fähigkeit der Weiterentwicklung so behandelter Zellen ist durch anschließende erfolgreiche Transplantationen auf geeignete Empfängertiere aufgezeigt worden (CHANG, 1947, 1948a). Nachfolgende Untersuchungen über das Verhalten älterer Entwicklungsstadien befruchteter Kanincheneizellen deuteten darauf hin, daß die Empfindlichkeit gegenüber niedrigen Temperaturen mit steigendem Alter zunimmt. Eine Erklärung hierfür konnte nicht gegeben werden (CHANG, 1948b, 1948c, 1950). Darüberhinaus verringerte sich unabhängig von Lagerungstemperatur und Entwicklungsstadium der Erfolg mit der Dauer des Aufenthalts bei diesen Temperaturen.

Der Versuch, befruchtete Kanincheneizellen bei extrem niedrigen Temperaturen (-79°C und -190°C) zu konservieren, verlief ohne nennenswerten Erfolg. Von 565 eingefrorenen, einzelligen Zygoten teilten sich nach dem Auftauen lediglich 6 weiter. Nur eine Zelle erreichte das 6-Zell-Stadium. Der Mißerfolg wurde auf die zu rasche Abkühlung zurückgeführt (SMITH, 1952). FERDOWS und Mitarbeiter (1958) konnten später die Bedeutung langsamer Temperatursenkung in Versuchen mit befruchteten Kanincheneiern bestätigen, nachdem bei einer Kühlgeschwindigkeit von weit weniger als $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ die weitere Entwicklungsfähigkeit der bei -79°C gelagerten Eizellen erhalten blieb. Der Beweis dafür wurde durch ihre Rücktransplan-

tation auf Empfängertiere erbracht. SHERMAN und LIN (1958a, 1958b, 1959) gaben den Anstoß zu Untersuchungen über die Möglichkeit der Tiefgefrierkonservierung von Eizellen am Modell der Labormaus (*Mus musculus*). Bis auf -10°C gekühlte, unbefruchtete Eier wurden nach dem Auftauen transplantiert und entwickelten sich nach Befruchtung zu normalen Feten.

In Anlehnung an die grundlegenden Versuche von CHANG in den Jahren 1947 bis 1950 hat man die Konservierungsfähigkeit befruchteter Schafseizellen untersucht. Die Geburt normal entwickelter Lämmer zeigte, daß die Methode auch bei dieser Spezies erfolgreich angewendet werden kann. Vor ihrer Transplantation lagerten die Eier bis zu 72 Stunden bei Temperaturen zwischen $+4^{\circ}$, $+5^{\circ}$ und $+13^{\circ}\text{C}$. Die unterschiedliche Eignung verschiedener Entwicklungsstadien wurde nicht überprüft (AVERILL und ROWSON, 1959) bzw. als nicht vorhanden bezeichnet (KARDYMOWICZ und Mitarbeiter, 1963).

In den erwähnten Untersuchungen, in denen das die Eier enthaltende Medium gefror, verwendete man Glycerin als Gefrierschutzsubstanz.

2.1.2. Die Tiefgefrierkonservierung befruchteter Mäuseeizellen

Der Begriff Tiefgefrierkonservierung bezeichnet die Aufbewahrung biologischer Objekte bei Temperaturen von -79°C oder darunter.

Über positive Ergebnisse der Eizelltiefgefrierkonservierung wurde erstmals im Jahre 1971 berichtet. WHITTINGHAM (1971a) lagerte befruchtete Mäuseeier im 8-Zell-Stadium und frühen Blastozystenstadium eine halbe Stunde bei -79°C . Der prozentuale Anteil der nach dem Auftauen sich bis zum Stadium der Blastozyste weiterentwickelnden Zellen war mit 69,1 % (8-Zell-Stadium) bzw. 91,2 % (junge Blastozyste) sehr hoch. Diese Zahlen bezogen sich

nicht auf die Gesamtzahl der nach der Konservierung zurückgewonnenen (Summe aus degenerierten, teildegenerierten und morphologisch unveränderten Zellen), sondern auf die "augenscheinlich normalen Embryos". Ihr prozentualer Anteil lag bei 74,7 % bzw. 68 %, gemessen an der Zahl der eingefrorenen Zellen. Eine Angabe über die Weiterentwicklung in bezug auf die Gesamtzahl der zurückgewonnenen Zellen fehlte (das Wiederauffinden aller Objekte ist durch Verluste bei Manipulation und völlige Zerstörung infolge der Konservierung meist nicht möglich). Die Transplantation nicht geschädigter Eizellen und ihre Weiterentwicklung in Empfängertieren waren der Beweis dafür, daß frühe Entwicklungsstadien eines Säugers die Kältekonservierung in relativ großer Anzahl unbeschadet überstanden hatten. Untersuchungen über die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit dieser Methode liegen bislang nicht vor.

Das hier von WHITTINGHAM als Gefrierschutzsubstanz verwendete Polyvinylpyrrolidon (PVP) und die relativ großen Kühl- und Auftauraten (ca. 60°C/min und ca. 84°C/min) wurden durch die Ergebnisse anderer Arbeiten in ihrer Tauglichkeit für die Tiefgefrierkonservierung befruchteter Mäuseeizellen nicht bestätigt (WHITTINGHAM und Mitarbeiter, 1972; WILMUT, 1972). Diese Untersuchungen machten deutlich, daß Kühl- und Auftaugeschwindigkeit gering sein mußten, wenn eine maximale Überlebensrate erreicht werden wollte. Zudem eignete sich Dimethylsulfoxid (DMSO) als Gefrierschutzsubstanz besser als PVP. Die Methodik der Kältekonservierung, des Auftauvorgangs und die Lagerungszeit in flüssigem Stickstoff (8 bis 12 Tage) waren bei beiden Autoren bis auf Art und Zeitpunkt der Zugabe von DMSO (siehe Tabelle 1) ohne wesentlichen Unterschied. Die optimale Konzentration der Gefrierschutzsubstanz lag bei 1 bis 1,5 Mol/Liter Medium. Größte Überlebensraten resultierten aus Abkühl- bzw. Auftaugeschwindigkeiten um $0,3^{\circ}\text{C/min}$ bzw. 4° , 12° und 25°C/min . Die Grundvoraussetzungen für die Beurteilung der Erfolge sind in beiden

TABELLE 1: ERGEBNISSE DER TIEFGEFRIERKONSERVIERUNG BEFRUCHTETER MÄUSEEIZELLEN IN FLÜSSIGEM STICKSTOFF

(nach WHITTINGHAM und Mitarbeitern, 1972 (1), und WILMUT, 1972 (2))

Zell- stadium	Art und Zeitpunkt der DMSO-Zugabe	Endkonzentration von DMSO im Medium	Kühlrate in ° C/min	Auftaurate in ° C/min	Weiterentwicklung bis zur Blastozyste in %
(1)					
1-Zeller	direkt bei 0° C	1 molar	0,3	5	(49)*
2-Zeller	" "	" "	0,3	5	68
8-Zeller	" "	" "	0,5	4/25	78
(2)					
8-Zeller	in 3 Schritten (je 0,5 Mol im Ab- stand von 10 Min.) bei 20° C	1,5 molar	0,22	12	65,8
junge Blastozyste	"	" "	0,22	12	85,7

* nur bis zum 2-Zell-Stadium kultiviert

Arbeiten unterschiedlich. WHITTINGHAM und Mitarbeiter (1972) gaben die Prozentzahlen der Zellen an, die sich nach dem Auftauen zur Blastozyste weiterentwickelten, bezogen auf die Gesamtzahl der zurückgewonnenen Zellen. WILMUT (1972) hingegen orientierte seine Angaben an der Zahl der nach dem Auftauen kultivierten Zellen. Dabei blieb unklar, ob alle wiedergewonnenen Eizellen kultiviert wurden (Ergebnisse beider Untersuchungen sind in Tabelle 1 zu finden). WHITTINGHAM und Mitarbeiter (1972) erbrachten im Gegensatz zu WILMUT (1972) den schlüssigen Beweis der ungeminderten Entwicklungsfähigkeit tiefgefrorener Eizellen durch erfolgreiche Transplantation.

Die Ergebnisse beider Autoren zeigen, was die unterschiedliche Tiefgefriertauglichkeit verschiedener Zellstadien betrifft, folgende Tendenz: 1-Zell-Stadien, obwohl nur kurz in Kultur, haben geringere Überlebenschancen als 2-Zell-Stadien; 8-Zell-Stadien können in diesen Vergleich nicht mit einbezogen werden, da Ergebnisse zweier Auftauraten zusammengefaßt wurden (WHITTINGHAM und Mitarbeiter, 1972). Blastozysten überstehen den Tiefgefrier- und Auftauprozess in größerer Zahl als 8-Zell-Stadien (WILMUT, 1972). Da die Versuchsanordnungen jedoch unterschiedlich sind, kann nicht generell gesagt werden, daß ältere Stadien sich besser zur Konservierung eignen.

In Anlehnung an das von WHITTINGHAM und Mitarbeitern (1972) beschriebene Tiefgefrierverfahren berichteten SCHNEIDER und Mitarbeiter (1974) über die Konservierung von 2-, 4- und 8-Zell-Stadien in flüssigem Stickstoff (2 Stunden bis 31 Tage). Die dabei erzielten Überlebensraten, bezogen auf die Zahl der aufgetauten Eizellen, betrugen 14,1, 58,4 und 44,2 %. Die erfolgreiche Transplantation der nach dem Auftauen aus diesen Zellstadien entstandenen Blastozysten schloß die Versuche ab. In diesen Ergebnissen findet man die weiter oben beschriebene Tendenz der besseren Tiefgefriertauglichkeit älterer Zellstadien nicht bestätigt.

Die Frage ob befruchtete Eizellen auch über die bisher bekannte Zeitspanne hinaus bei niedrigen Temperaturen gelagert werden können, ist von WHITTINGHAM und WHITTEN (1974) geklärt worden. Mäuseeier im 8-Zell-Stadium entwickelten sich nach 189- bzw. 222-tägigem Aufenthalt in flüssigem Stickstoff zu 92 % bzw. 88 % weiter zur Blastozyste. Diese Prozentzahlen bezogen sich wieder auf die Anzahl der zurückgewonnenen Zellen (35 von 38 bzw. 22 von 25 eingefrorenen Zellen). Insgesamt wurden 64 Eier nach der Methode von WHITTINGHAM und Mitarbeitern (1972) tiefgefroren und wieder aufgetaut. Aus den 57 anschließend transplantierten Blastozysten entwickelten sich 29 zu normalen Feten bzw. lebenden Jungtieren.

2.1.3. Die Tiefgefrierkonservierung befruchteter Rinder-eizellen

In Anlehnung an die Erfolge mit der Methode der Tiefgefrierkonservierung von Mäuseeizellen wurden von WILMUT und ROWSON (1973) Versuche mit befruchteten Rindereizellen durchgeführt. Zwei der neun transplantierten Blastozysten wuchsen zu palpierbaren Früchten heran.

2.2. In-vitro-Kultivierung von Mäuseeizellen

2.2.1. Superovulation und Eigewinnung

Voraussetzung für die Durchführung systematischer Kultivierungs-, Konservierungs- und Transplantationsversuche mit Eizellen, war die Entwicklung geeigneter Methoden, die die Gewinnung einer möglichst großen Zahl von Eizellen zu einem vorher bestimmbareren Zeitpunkt erlaubten.

Bei Mäusen läßt sich die Ovulation durch kombinierte Anwendung von Pregnant Mares' Serum (PMS) und Human Chorionic Gonadotropin (HCG) willkürlich herbeiführen (RUNNER und PALM, 1953).

Aus dieser an nicht geschlechtsreifen Tieren erprobten

Methode entwickelten sich alle späteren Verfahren und wurden mit gleichem Erfolg auch bei geschlechtsreifen Mäusen angewendet.

Die Dosierung von PMS und HCG, die nacheinander im Abstand von 40 bis 48 Stunden intraperitoneal (i. p.) injiziert wurden, schwankten jeweils zwischen 1 und 15 Internationalen Einheiten (FOWLER und EDWARDS, 1957; SHERMAN und LIN, 1959; EDWARDS und GATES, 1959; BRINSTER, 1963, 1965a).

Unabhängig von der verwendeten Menge HCG vergrößert sich die Anzahl der ovulierten Eier mit steigender PMS-Dosis (ALLEN und MCLAREN, 1971). Diese Tatsache war für alle von FOWLER und EDWARDS (1957) untersuchten Rassen gültig, auch wenn die Reaktionen auf solche Hormone unterschiedlich in Erscheinung traten. Die Frage, ob der Erfolg dieser Methoden von der jeweiligen Zyklusphase des Tieres bei Injektion abhängig war, wurde verneint. Auch die Applikation der Hormone zu beliebiger Tages- und Nachtzeit hatte keinen Einfluß auf die Wirksamkeit des Verfahrens (FOWLER und EDWARDS, 1957; EDWARDS und GATES, 1959).

In späteren Arbeiten ging man zu einer Vereinheitlichung der Behandlungsformen über und wählte einen Abstand von 48 Stunden zwischen der Verabreichung von HCG und PMS. Die Dosierung der beiden Hormone variierte zwischen 3 und 10 Internationalen Einheiten (I.E.).

Unmittelbar nach dem Einsatz von HCG wurden die Tiere individuell gepaart (WHITTINGHAM, 1968; WHITTINGHAM, 1971a; IWAMATSU und CHANG, 1971; WHITTINGHAM und Mitarbeiter, 1972; WILMUT, 1972). In dem Zeitraum von 8 bis 11 Stunden nach HCG-Injektion erfolgt die Kopulation (EDWARDS und GATES, 1959). Angaben darüber, wie viele Tiere auf die Behandlung ansprechen, schwanken zwischen 75 % und 96 % (FOWLER und EDWARDS, 1957; KELLY, 1971).

Nach Beobachtungen von RUNNER und PALM (1953) und EDWARDS und GATES (1959) erfolgte die Ovulation etwa zwischen der 11. und 14. Stunde nach der HCG-Injektion.

Grundsätzlich bieten sich zwei Formen der Eigewinnung aus Ovidukt und Uterus an. SIMPSON und WILLIAMS (1948), RUNNER und PALM (1953), MCLAREN und MICHIE (1956) und WHITTINGHAM (1968) zerfranst den Eileiter oder eröffnen ihn durch eine kleine Incision. Durch vorsichtiges Ausstreifen gelangten die Eier in das Medium.

Andere Autoren wählten die Methode des Ausspülens, die wegen der geringen Größe der Organe mit feinstem Gerät erfolgen muß. Eileiter und Uterus wurden getrennt, eine Kanüle in den Fimbrientrichter eingeführt und die Eier unter leichtem Flüssigkeitsdruck ausgetrieben (BRINSTER, 1965a; RAFFERTY, 1970; WHITTINGHAM, 1971a; WILMUT, 1972). Liegt der Zeitpunkt der Ovulation mehr als 2,5 Tage zurück, befinden sich nahezu alle Eier im Uterus. Aus diesem Teil des Genitaltraktes verläuft der Vorgang der Eigewinnung entsprechend. Bei allen Manipulationen dieser Art wird zur besseren Übersicht und Kontrolle ein Mikroskop empfohlen (RAFFERTY, 1970).

Für die Methode der Ausspülung sprechen die Schnelligkeit, weniger mechanische Schäden an den Eiern und weit- aus weniger Fremdzellmaterial in der Spülflüssigkeit. In jedem Fall ist es jedoch notwendig, die Gewinnung mit größtmöglicher Eile zu betreiben, um den ungünstigen Einfluß von Gewebsteilen, Flüssigkeiten aus Ovidukt bzw. Uterus und Zelltrümmern auf die Eier gering zu halten. Die alsbaldige Umsetzung in frisches Medium ist erforderlich (BRINSTER, 1969a).

2.2.2. Kulturmedien und ihre Zusammensetzung

Die heute verwendeten Medien, die eine Weiterentwicklung früherer Stadien befruchteter Eizellen außerhalb des Muttertieres ermöglichen, leiten sich von der von WHITTEN (1956) beschriebenen und modifizierten Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung (KRBL) ab. Nach weiterer Vervollständigung durch "Energielieferanten" wie Laktat oder Pyruvat wird die in-vitro-Entwicklung von Mäuseeizellen vom

2-Zell- bis zum Blastozystenstadium möglich (BRINSTER, 1963a, 1965b).

TABELLE 2: MEDIUM FÜR IN-VITRO-KULTIVIERUNG VON BEFRUCHTETEN MÄUSEEIZELLEN IM 2-ZELL-STADIUM (nach BRINSTER, 1963a)

Komponente	Konzentration (g/l)
1. NaCl	6,384
2. KCl	0,356
3. CaCl_2	0,189
4. KH_2PO_4	0,162
5. $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,294
6. NaHCO_3	2,106
7. Na-Laktat	1,147
8. Kristallines BSA	1,000
9. Penicillin	100 I.E./ml
10. Streptomycin	50 µg/ml

Organische Bestandteile wie Laktat, Pyruvat, Glukose, "Bovine Serum Albumin" (BSA) und Antibiotika sowie die anorganischen Verbindungen der Krebs-Ringer-Lösung wurden von verschiedenen Autoren in ihren Gewichtsanteilen pro Volumen immer wieder verändert (BIGGERS und Mitarbeiter, 1967; WHITTINGHAM, 1968; WHITTEN und BIGGERS, 1968). Daraus resultierende Vorteile für das Wachstum der Eier wurden nie erwähnt. Das modifizierte Medium "Dulbeccos's phosphate-buffered salt solution" (PBS) nach DULBECCO und VOGT (1954) hat sich zur Kultivierung von Mäuseeizellen ebenfalls bewährt (WHITTINGHAM und WALES, 1969) und fand später in mehreren Untersuchungen über die Tiefgefrierkonservierung genannter Zellen routinemäßige

Verwendung (WHITTINGHAM, 1971a; WHITTINGHAM und Mitarbeiter, 1972; WILMUT, 1972; WHITTINGHAM und WHITTEN, 1974). Die organischen Bestandteile entsprechen denen des Krebs-Ringer-Mediums.

Wiederholt weisen Autoren auf die ausschließliche Verwendung von Penicillin in Form seines Kaliumsalzes hin, ohne einen Grund für diese Bedingung anzuführen (BRINSTER, 1965a; WHITTINGHAM und BIGGERS, 1967; WHITTINGHAM, 1968, 1971a; WHITTEN und BIGGERS, 1968).

In einer eingehenden Studie über die Auswirkung von pH-Wert-Verschiebungen und/oder Veränderungen der Osmolarität (in osm) auf die Entwicklung von Mäuseeiern in-vitro wurde festgestellt, daß von den Zellen ein relativ weiter Spielraum toleriert wird. Der pH-Wert erstreckte sich von 5,87 bis 7,78, die Osmolarität von 0,2002 bis 0,3542 osm, wobei die optimalen Werte bei pH 6,82 und 0,276 osm liegen. Ihre Einstellung auf die erforderlichen Maße geschah durch Gewichtsveränderungen anorganischer Bestandteile (Osmolarität) bzw. durch Verschiebungen des gegenseitigen Verhältnisses von NaHCO_3 und NaCl (pH-Wert), während die anderen Komponenten unberücksichtigt blieben (BRINSTER, 1965a). Die Möglichkeit, die Osmolarität durch die Menge von NaCl oder destilliertem Wasser allein zu beeinflussen, ist zwar gegeben, doch im Hinblick auf die Verdünnung aller Bestandteile des Mediums (durch H_2O) negativ zu bewerten (WHITTINGHAM, 1971b).

WHITTINGHAM (1971b) stellte an die Herstellung von Kulturmedien folgende Forderungen:

Verwendung von destilliertem Wasser höchsten Reinheitsgrades (elektrischer Widerstand von mind. 7×10^5 Ohm), Reinheit der chemischen Bestandteile und exakte Messung der angegebenen Gewichtsanteile zur Einhaltung gleicher Versuchsbedingungen, Zusammenstellung des Mediums kurz vor dem Versuch.

Die Aufbewahrung des Mediums bei $+ 5^\circ \text{C}$ über einen Zeitraum von 1 Monat verminderte die Entwicklungsfähigkeit

von Eizellen und wurde als Folge spontaner Dekarboxylierung des Pyruvats angesehen (WALES und WHITTINGHAM, 1971).

2.2.3. Methoden zur Aufbewahrung von Eizellen

Die heute allgemein übliche Form der in-vitro-Kultivierung basiert auf der "Mikrotropfen-Methode" von BRINSTER (1963a). Kleine Tropfen (ca. 0,1 ml) mit den darin enthaltenen Eizellen wurden mit 10 ml dünnflüssigem Paraffin überschichtet. Das fertige, sterile Medium lagerte bis zu seinem Gebrauch in einer Gasatmosphäre von 5 % CO_2 in Luft. Mehrere Tage vor seiner Verwendung vermischte (equilibrierte) man zudem das Öl mit der Salzlösung (siehe Tabelle 2, Komponenten 1 bis 7) im Verhältnis 20 : 1 durch einen eingeleiteten Gasstrom genannter Zusammensetzung. Diesen vorbereitenden Maßnahmen folgte die eigentliche Kultivierung bei 37° C im Brutschrank, der seinerseits von dem erwähnten CO_2 -Luft-Gemisch ständig durchströmt wurde.

Die Verwendung von equilibriertem Paraffin verhindert, daß durch Verdampfen des Mediums Konzentrations- und durch CO_2 -Verlust ph-Veränderungen stattfinden. Solange aber das im Medium vorhandene CO_2 nicht entweichen kann, steht es im Gleichgewicht mit dem Bikarbonat und hält so dessen Zerfall auf. Der ph-Wert bleibt daher innerhalb tolerierbarer Grenzen. Viele Teile der Salzlösung sind zudem öllöslich. Selbst wenn ihre Löslichkeit gering ist, so könnte die Zusammensetzung des Mediums in Form des Mikrotropfens deshalb stark verändert werden, weil das Ölvolumen so viel größer ist als das des Mediums. Um übermäßige Schaumbildung beim Equilibrierungsvorgang zu vermeiden, wird BSA von diesem Prozeß ausgeschlossen, da Proteine in diesem Zusammenhang leicht zur Denaturierung neigen (RAFFERTY, 1970).

Nach Aussagen von WHITTINGHAM und WALES (unveröffentlicht) gelang die Kultivierung von 2-Zell-Stadien jedoch

auch ohne die erwähnte Öl-Medium-CO₂-Vermischung.

Bei einer anderen Methode der Aufbewahrung benutzte man kleine Röhrchen mit geringer Menge Medium (ca. 1 ml), ohne sich die schützende Wirkung von Paraffin zunutze zu machen (HAMMOND, 1949; WHITTEN, 1956). Diese Art der Aufbewahrung ist dann von Vorteil, wenn mit einigen hundert Eizellen gleichzeitig gearbeitet wird, und sie schnell umgesetzt oder verteilt werden müssen. Der Nachteil aber liegt in der Kompliziertheit der optischen Kontrolle (RAFFERTY, 1970).

Obwohl Säugereier mit einer Vielzahl von Methoden kultiviert werden können, findet meist die eingangs beschriebene Mikrotropfen-Methode nach BRINSTER (1969b) Verwendung (WHITTINGHAM, 1971b).

2.2.4. Entwicklung der Eizellen

Der Zeitraum, in dem sich die Ovulation nach hormonaler Stimulierung vollzieht, ist weiter oben (2.2.1.) mit 11 bis 14 Stunden nach HCG-Injektion angegeben. Da Schwankungen hinsichtlich des Zeitintervalls der Ovulation und des Zeitpunktes der Kopulation bestehen, ist es ratsam, das Eialter in Relation zur HCG-Injektion zu setzen (Std. nach HCG). Bei natürlichem Eisprung wählt man die mit einer Ejakulation verbundene Kopulation als zeitlichen Bezugspunkt (WHITTINGHAM, 1971b). Die stattgehabte Kopulation mit Ejakulation kann durch den in der Scheide liegenden, deutlich sichtbaren Pfropf (englisch: plug), der durch Vermischung von Sperma und Sekret der Koagulationsdrüsen entsteht (MAUSS und Mitarbeiter, 1970), zeitlich festgelegt werden. Das Eialter ist somit nicht exakt bestimmbar.

Im Zusammenhang mit Untersuchungen an Eizellen ist es erforderlich zu wissen, wo und zu welcher Zeit bestimmte Entwicklungsstadien im Genitaltrakt auffindbar sind. Dazu eignet sich der Übersicht halber eine tabellarische Auf-

stellung, in der Aufschluß über die Verhältnisse nach spontaner und induzierter Ovulation gegeben wird (Tabelle 3).

TABELLE 3: ALTER, ENTWICKLUNGSSTADIUM UND AUFENTHALTSORT BEFRUCHTETER MÄUSEEIZELLEN IN-VIVO NACH SPONTANER⁽¹⁾ UND HORMONINDUZierter⁽²⁾ OVULATION (nach RUGH, 1968⁽¹⁾ und WHITTINGHAM und Mitarbeiter, 1972⁽²⁾)

Zeit nach Kopulation ⁽¹⁾ / HCG-Injektion ⁽²⁾ (in Stunden)	Entwicklungsstadium	Aufenthaltort im Genitaltrakt
(1)		
21 - 43	2-Zell-Stadium	Eileiter
38 - 50	4-Zell-Stadium	"
50 - 64	8-Zell-Stadium	"
60 - 70	16-Zell-Stadium (Morula)	Eileiter/Uterus
66 - 80	Blastozyste	Uterus
(2)		
22	1-Zell-Stadium	Eileiter
44 - 46	2-Zell-Stadium	"
66 - 70	8-Zell-Stadium	"
90 - 96	junge Blastozysten	Uterus

Durch systematische Studien in-vitro konnte gezeigt werden, daß die Teilungen mit zunehmendem Alter immer rascher aufeinander folgen und bald asynchron verlaufen (RUGH, 1968).

Am 5. Tag der Trächtigkeit findet man die Blastozyste ohne Zona pellucida. Der Trophoblast nimmt Kontakt mit

der Uterusschleimhaut auf, und der Vorgang der Implantation beginnt (ORSINI und MCLAREN, 1967; BERGSTRÖM, 1972).

Die Fähigkeit der Blastozyste, eine gewisse Zeit auf einer Entwicklungsstufe verharren zu können, bis das Endometrium für die Nidation bereit ist, geht aus den Beschreibungen von GATES (1965) hervor. Diese Tatsache ist der Grund für die verlängerte Tragezeit bei noch säugenden Muttertieren (TARKOWSKI, 1959).

Bei adulten, hormonbehandelten Mäusen erstreckt sich die Ovulation maximal über einen Zeitraum von drei Stunden (11. bis 14. Std. nach HCG). Erst gegen Ende der 16. Stunde nach HCG findet man bei fast allen Eizellen Spermien im Vitellus (EDWARDS und GATES, 1959).

Das Intervall zwischen Befruchtung der ersten und 90 % aller Eizellen wird mit zehn Stunden angegeben (bei Superovulation nicht geschlechtsreifer Tiere). Damit ist teilweise die Tatsache erklärt, daß man zu bestimmter Zeit im weiblichen Genitale verschiedene Entwicklungsstufen finden kann. Zum anderen wird diese natürlich bedingte Asynchronisation vermutlich von gehemmter oder zum Stillstand gekommener Entwicklung und mitotischer Teilungsrate beeinflußt. Letzteres konnte bei der in-vitro-Kultivierung von Mäuseeiern bestätigt werden. Die Teilungsraten unterschieden sich signifikant. Diese individuellen Unterschiede in der Entwicklung in-vivo wurden bei superovulierten, nicht geschlechtsreifen sowie hormonbehandelten, geschlechtsreifen Mäusen gefunden.

Einen Einfluß auf die Teilungsrate scheint auch die Herkunft der Eizellen zu haben. Hybrider Paarung entstammende Eizellen haben im Vergleich zu denen aus Inzucht hervorgegangenen eine deutlich größere Teilungsrate in-vivo (GATES, 1965).

Die Entwicklungskapazität von Blastozysten aus spontaner und (vor Geschlechtsreife) induzierter Ovulation ist gleich groß, betrachtet man die daraus entstandenen Feten (GATES, 1956; MCLAREN und MICHIE, 1956).

Im Verlauf der in-vivo-Entwicklung vom 2-Zell- bis zum Blastozystenstadium verdoppelt sich die Anzahl der Blastomeren spontan ovulierter Mäuseeizellen konstant alle 10 Stunden. Bei entsprechend langer in-vitro-Kultivierung jedoch verringert sich die anfangs gleich große Teilungsrate, und die Verdoppelung dauert bald 24 Stunden. Da aber während dieser Untersuchung die Temperatur im Brutschrank bei 36°C lag, und die durchschnittliche Körpertemperatur von Mäusen höher ist (rektale Temperatur $> 38^{\circ}\text{C}$; ELLIOTT und Mitarbeiter, 1968; ELLIOTT und ULBERG, 1971), wird hierin ein Grund für die verlangsamte Entwicklung vermutet. Außerdem bietet die Kultur ein weniger ideales Milieu als der weibliche Genitaltrakt (BOWMAN und MCLAREN, 1970). Ungeachtet des Alters der Spendertiere (praepubertär oder adult) und der Dosis der Hormone, teilen sich superovulierte Eizellen in-vivo mit gleicher Rate wie die aus der natürlichen Ovulation; sie beginnen jedoch etwa fünf Stunden früher mit ihrer ersten Teilung. Die Ursache dafür könnte in dem bei hormonbehandelten Tieren eher eintretenden Eisprung liegen (ALLEN und MCLAREN, 1971).

Untersuchungen über das Verhalten superovulierter Eizellen in-vivo im Vergleich zu ihrer Brutschrankkultivierung bzw. die unterschiedliche in-vitro-Entwicklung superovulierter und spontan gesprungener Zellen sind nicht bekannt.

Die Eignung eines Kulturverfahrens, einer bestimmten Tierrasse und eines Mediums für die experimentelle Embryologie wird am Beispiel befruchteter Eizellen durch den Umfang ihrer Weiterentwicklung außerhalb des weiblichen Genitaltraktes gemessen. Sind die zu untersuchenden Objekte darüberhinaus größeren Belastungen (Tiefgefrierkonservierung) unterworfen, so muß zur Beurteilung ihrer Reaktion eine Kontrollgruppe herangezogen werden.

Die Entwicklung von 2-Zell-Stadien bis zur Blastozyste ist oft beschrieben. So schwanken die Prozentzahlen je nach Rasse zwischen 58 und 83 % bei adulten (55 und 81 %

bei praepubertären) Tieren, wobei mit Hybrid- und Rückkreuzungsprodukten die größten Erfolge, jeweils größer als 80 %, erzielt wurden (GATES, 1965). In den Untersuchungen von WHITTINGHAM und WALES (1969) ist ohne Angabe von Rasse und Alter eine Zahl von 72 % genannt. Zygoten erreichten, wieder in Abhängigkeit von der verwendeten Rasse, bis zu 75 % das Stadium der Blastozyste. Auch hier wird der Hybridisierungseffekt als günstig beschrieben (WHITTEN und BIGGERS, 1968).

Die einzige zahlenmäßige Angabe über Kultivierungserfolge mit 8-Zellern bis zur Blastozyste macht WILMUT (1972) mit 84 %.

Diesen Ergebnissen jedoch liegen, was Art und Zusammensetzung des Mediums und Stamm der Tiere betrifft, unterschiedliche Voraussetzungen zugrunde.

Da die Eizellen während der Manipulationen mehr oder weniger lange Zeit einer Temperatur ausgesetzt sind, die unter der physiologischen Norm liegt, war die Frage nach den Folgen solcher Behandlung Gegenstand vieler Untersuchungen. In keinem Fall jedoch konnte eine nachteilige Auswirkung durch Temperaturen um 20° C (Zimmertemperatur) nachgewiesen werden (RUNNER und PALM, 1953; WALES und BIGGERS, 1968; BRINSTER, 1969a). Lediglich RAFFERTY (1970) begrenzte die Zeit der Manipulation auf "ungefähr eine Stunde".

2.3. Der Einfluß niedriger Temperaturen auf die lebende Zelle

Die Bemühungen um Klärung dieser Frage in theoretischer und praktischer Hinsicht sind vielfältig. Die an anderen biologischen Objekten (z. B. Knochenmarkszellen) gewonnenen Erkenntnisse versuchte man auf Eizellen zu übertragen, wobei man nicht sicher sein konnte, ob ihre Gültigkeit sich auch an diesen mehrzelligen Systemen beweisen ließ.

Bevor die so entscheidenden Ereignisse des Gefriervorgangs betrachtet werden, muß das Verhalten der Zelle

während ihrer Abkühlung bis zum Beginn der Eisbildung besprochen werden.

2.3.1. Temperaturschock und Eizelle

Der Begriff TEMPERATURSCHOCK tauchte in der Literatur erstmals bei MILOVANOV (1934) im Zusammenhang mit Untersuchungen an Sperma auf, das durch schnelle Kühlung geschädigt wurde. Diesen Ausdruck übernahmen einige Jahre später CHANG und WALTEN (1940) und erklärten damit die verminderte respiratorische Aktivität von Spermien, die in vorgekühlte Gefäße verbracht wurden. Eine entsprechend schnelle Erwärmung schien keine Schädigung zu haben. Aussagen über Kühl- oder Wärmeraten fehlten.

"Wenn lebende Zellen durch schnelle Kühlung auf 0°C oder auf Temperaturen um 0°C geschädigt werden, betrachtet man sie als empfindlich gegenüber dem Phänomen des Temperaturschocks" (SHERMAN und LIN, 1959). Die Folge des Temperaturschocks wurde von diesen beiden Autoren als "Veränderung bestimmter physiologischer Funktionen verschiedener Zelltypen" aufgefaßt. So zeigte sich am Beispiel von Mäusespermien ein deutlicher, irreversibler Motilitätsverlust infolge schneller Kühlung.

Eine Klärung der Vorgänge erfolgte durch die Beschreibung von Veränderungen an den einzelnen Bauelementen der Zelle. Im Verlauf des Abkühlungsprozesses kommt es, neben Einschränkungen metabolischer Aktivitäten, zu räumlichen Veränderungen an den inneren und äußeren, umhüllenden Strukturen und zur Kontraktion der Protoplasmabestandteile. Da zudem weitere chemische Komponenten der Zellbestandteile dieser Veränderung unterworfen sind, werden sie sich ihrem Charakter entsprechend unterschiedlich verhalten. Erfolgt die Kühlung langsam, wird der Zelle Gelegenheit gegeben, sich den Veränderungen schrittweise anzupassen. Im anderen Falle geht die Synchronisation verloren und irreparable Schäden werden gesetzt (SALISBURY und VANDEMARK, 1961).

CHANG (1947) untersuchte den Einfluß niedriger Temperaturen (von 0°C bis $+25^{\circ}\text{C}$) auf die Lebensaktivität befruchteter Kanincheneizellen. Dabei stellte sich heraus, daß eine schnelle Kühlung die Eier abtötete, eine langsame Kühlung (20°C in 4 Stunden) dagegen relativ unbedeutende Folgen hatte. Diese negative Auswirkung schrieb der Autor dem Phänomen des Temperaturschocks zu, ohne aber eine Erklärung dieser Erscheinung zu geben. Die Definition des Ausdrucks "schnelle Kühlung" fehlt.

Durch verschiedene Untersuchungen über die Auswirkungen tiefer Temperaturen auf die Eizelle konnte die Annahme von CHANG (1947) widerlegt werden. Säugereizellen sind schnellen Temperaturveränderungen bis 0°C (ΔT ca. 1°C/sec) gegenüber unempfindlich (SHERMAN und LIN, 1959; WHITTINGHAM, 1971a; WILMUT, 1970; WILMUT und ROWSON, 1973).

2.3.2. Chemisch-physikalische Vorgänge innerhalb und außerhalb der Zelle

Der Begriff des "Supercooling" oder der "Unterkühlung" ist von vielen Autoren ohne genaue Definition verwendet worden und wurde ein fester Bestandteil im Sprachgebrauch derer, die sich mit dem Thema der Kältekonserverung lebender Zellen befaßten. Eine umfassende Beschreibung des Supercooling und seiner Grundlagen findet man bei HAYDN (1968).

Die Frage nach den Vorgängen innerhalb und außerhalb der Zelle während ihrer Kühlung bis zu extrem niedrigen Temperaturen wurde häufig aufgegriffen, und man entdeckte gesetzmäßige Reaktionen als Folge der Kälteeinwirkung.

So widmete sich MERYMAN (1956) eingehend diesem Thema. Er nannte das Gefrieren "nichts anderes als die Entfernung reinen Wassers aus einer Lösung und seine Isolierung zu biologisch inerten Fremdkörpern, den Eiskristallen" und stellte diese Betrachtung seinen Ausführungen voran.

Werden im Zellinneren Eiskristalle gefunden, behauptet der Autor, ist schnell gekühlt worden, fehlen die Kri-

stalle, so ist das Gegenteil anzunehmen. Wird ein die Zellen enthaltendes Medium langsam gekühlt, beginnt zu bestimmter Zeit das extrazelluläre Eiswachstum. Nicht gebundenes Wasser geht teilweise in Eis über, die Elektrolyte werden konzentriert, und der osmotische Druck steigt. Aus diesem Grund ist die Zelle gezwungen, freies Wasser nach außen abzugeben, das in den Kristallisationsvorgang wiederum mit einbezogen wird. Ist dieser Prozeß bei kontinuierlichem Temperaturabfall beendet, so ist alles freie Wasser in Eis umgewandelt, und die hohe Elektrolytkonzentration kann die Zelle schädigen. Hat aber eine Zelle die steigende Salzkonzentration bis zum Erreichen von -10°C ohne Schäden überstanden, dann vermindert sich das chemische Potential (Denaturierung) bei weiterer Abkühlung logarithmisch und erreicht bei ca. -100°C einen Stillstand. MERYMAN fügt noch hinzu, daß die steigende Elektrolytkonzentration eine Gefrierpunktserniedrigung bewirkt, die ihrerseits der Eisbildung entgegenwirkt.

Die hohe Elektrolytkonzentration außerhalb der Zelle schädigt die Lipide derart, daß die Membranoberfläche Lücken bekommt. Durch diese undichten Stellen dringen beim Erwärmen infolge der Reexpansion der Zelle konzentrierte Salzlösungen und bewirken einen osmotischen Schock (LOVELOCK, 1954a).

Zu der gleichen Aussage gelangt MERYMAN (1968). Er bezeichnet die entstandenen Membranlücken als Folge des hohen osmotischen Drucks. Da die Zelle nicht weiter als auf 55 % ihres normalen Volumens schrumpfen kann, wird ihre Oberfläche durch die steigenden Kräfte perforiert. Beim Erwärmen tritt dann der oben erwähnte osmotische Schock ein.

Als SHERMAN und LIN (1958b) nach schneller Abkühlung und gleichzeitigem Wechsel des Aggregatzustandes die völlige Degeneration unbefruchteter Mäuseeizellen feststellten, verbanden sie diese Tatsache mit der Beobachtung von intrazellulärem Eis. Konnte jedoch durch Verminderung der Kühlrate ($0,7^{\circ}\text{C/min}$) die Dehydrierung der Eizellen er-

reicht und damit eine interne Eisbildung verhindert werden, so blieb die Struktur der Zellen unzerstört.

In den Beschreibungen von MAZUR (1963, 1966, 1970) werden weiter physikalische Abläufe verdeutlicht. Er geht von der Betrachtung einer Zelle aus, die sich in wässrigem Medium befindet, welches gerade zu gefrieren beginnt. Die Temperatur liegt unter dem Gefrierpunkt des Protoplasmas. Das Wasser innerhalb der Zelle ist im "Supercoolingbereich" und hat demnach einen höheren Dampfdruck als das die Zelle umgebende Eis. Dieser Druckunterschied bewirkt den Austritt des Wassers aus der Zelle. Ist das System während ausreichend langsamer Kühlung in der Lage, den Druckausgleich (Equilibrierung) ständig herbeizuführen, so kann innerhalb der Zelle kein Eis gebildet werden. Eiskristalle, klein genug, um durch Membranlücken ins Zellinnere zu wachsen, haben aber einen zu kleinen Krümmungsradius, um bei Temperaturen bis -10°C existieren zu können. Kann der Dampfdruckunterschied nicht ausgeglichen werden (zu schnelle Abkühlung, relative Wasserdurchlässigkeit der Membranen), wird er durch Eisbildung in der Zelle spontan beseitigt.

Mit der einsetzenden Eisbildung und folgender Dehydrierung steigen außerhalb bzw. innerhalb der Zelle die Konzentrationen der Lösungen und können folglich toxisch wirken. Da verschiedene Zelltypen Unterschiede in bezug auf die Wasserdurchlässigkeit ihrer Oberflächenmembranen aufweisen, ist damit auch die entsprechende Kühlgeschwindigkeit, die Schäden verhindert, bestimmt. Eine weitere Abhängigkeit ist durch das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen gegeben. Dieses Verhältnis ist bei großen, kugeligen Zellen kleiner als bei kleinen Zellen, und es ist zu erwarten, daß erstgenannte Objekte weniger Wasser in einem gegebenen Zeitintervall verlieren können. Die Frage nach der optimalen Kühlgeschwindigkeit beantwortet der Autor mit: "sie muß so gering sein, daß zerstörende intrazelluläre Eisbildung verhindert wird und gleichzeitig groß genug, um die Einwirkungszeit konzentrierter Lösungen auf Membranen auf ein vertretbares Maß zu redu-

zieren". MAZUR bekräftigte seine Aussagen durch exakte mathematische Formulierungen, in denen die zu berücksichtigenden physikalischen Größen in ein bestimmtes Verhältnis zueinander gebracht wurden.

Zwei grundsätzliche Möglichkeiten der Schadwirkungen führen LEIBO und Mitarbeiter (1970) an und unterstützen die Feststellungen des vorausgenannten Autors. Intrazelluläres Eis und Konzentrationsveränderungen der Lösungen, beide von der Kühlrate abhängig, zerstören die Zellen, wobei die innenliegenden Eiskristalle nicht als unbedingt schädlich angesehen werden. Vielmehr besteht die Gefahr der Rekristallisation und das damit verbundene Größenwachstum der Kristalle beim Auftauen schnellgefrorener Objekte.

Schnelle Abkühlung bewirkt nicht nur intrazelluläre Eisbildung, sondern formt auch instabile Kristalle, die während der Erwärmung aufgrund ihrer großen, freien Oberflächenenergie zu wachsen beginnen (MAZUR, 1970).

In Versuchen mit Hefezellen wurde eine Ursache möglicher Schädigung durch ungewollt schnelle Abkühlung beschrieben. Bei langsamer Kühlung eines Mediums unter den Gefrierpunkt des Wassers ist zu bestimmter Zeit der Punkt erreicht, an dem die Eiskristallbildung spontan einsetzt. Infolge freiwerdender Kristallisationswärme steigt die Temperatur wieder sprunghaft bis in die Nähe von 0°C , um sich dann erneut, sobald die Wärme absorbiert ist, ebenso schnell der der Kühlflüssigkeit anzugleichen. Dieser rapide Wechsel schädigte die Zellen derart, daß man dazu übergang, die Eisbildung schon bei -2°C zu induzieren. Die Ausschaltung der in sehr kurzer Zeit erfolgenden, großen Temperaturschwankungen ($\Delta T \sim 8^{\circ}\text{C}$) erhöhte die Überlebensrate um 40 % (MAZUR, 1966).

2.3.3. Gefrierschutzsubstanzen und ihre Wirkungen

Die Einteilung der Gefrierschutzsubstanzen erfolgte nach dem Maß ihrer Penetrationsfähigkeit durch Zellmembranen (LOVELOCK, 1954b; WILMUT, 1972). Das Polymer PVP findet im Gegensatz zu Glyzerin und DMSO keinen Eingang in die Zelle.

Waren auch viele andere Substanzen wie Zucker, Amide und Alkohole (LOVELOCK, 1954b) oder anorganische Salze (PAN THE TRAN und BENDER, 1960) mit mehr oder weniger Erfolg zum Schutz lebender Zellen eingesetzt worden, so galt den Substanzen PVP, Glyzerin und DMSO die meiste Aufmerksamkeit.

In den Untersuchungen über die Wirksamkeit als Gefrierschutzsubstanz ist PVP mit einem K-Wert (bestimmt durch die relative Viskosität einer 1 %igen Lösung und abhängig vom Molekulargewicht) von 30 verwendet worden. Das durchschnittliche Molekulargewicht beträgt 40.000, wobei das Gewichts-Spektrum von 1.000 bis 200.000 reicht (ASHWOOD-SMITH und WARBY, 1971) und damit seine geringe osmotische Aktivität festlegt (MAZUR und Mitarbeiter, 1969). Glyzerin und DMSO, beides hydrophile Nicht-Elektrolyte (FARRANT, 1965) unterscheiden sich hierin deutlich von dem Polymer. Ihre Molekulargewichte sind 92,1 bzw. 78,1 und erklären damit ihre Fähigkeit, in die Zelle einzudringen (FARRANT, 1969). Beide Substanzen zeigen stark dehydrierende Wirkung (SHERMAN und LIN, 1958a; WHITTINGHAM und WALES, 1969; WILMUT, 1972).

Aussagen über die Toxizität von PVP und DMSO werden von mehreren Autoren gemacht.

PVP-Konzentrationen über 1 % hemmen bei länger dauerndem Kontakt mit Eizellen deren Weiterentwicklung (WHITTINGHAM, unveröffentlicht). Tatsächlich aber scheinen nur relativ niedermolekulare, durch Dialyse abtrennbare Bestandteile ($MG < 12.000$) schädigend zu wirken, wie dies am Beispiel von Pseudomonas-Bakterien gezeigt wurde. Diese Schädigung tritt allerdings nur im Zusammenhang mit der Gefrier-

konservierung dieser Einzeller in Erscheinung. Wurden die niedermolekularen Stoffe entfernt, so verlor die verbleibende Substanz ihren toxischen Einfluß (ASHWOOD-SMITH und WARBY, 1971).

Bei dem Vergleich der Einflüsse von dialysiertem und nicht dialysiertem PVP erwies sich eine Konzentration von 7,5 % in PBS im ersten Fall als unschädlich, im zweiten als deutlich toxisch. Junge Blastozysten, die vor ihrer in-vitro-Kultivierung im Brutschrank vier Stunden lang bei + 20° C unter Einwirkung jeweils eines dieser Stoffe standen, wurden nach ihrer Umsetzung in KRBL am Folgetag auf ihre Weiterentwicklung hin überprüft. Diejenigen Eizellen, die mit dem Dialysat Kontakt hatten, teilten sich zu einem Prozentsatz von 85,3 weiter. Der entsprechende Wert der anderen Gruppe (Kontakt mit nicht dialysiertem PVP) lag mit 1,3 % signifikant niedriger ($P \leq 0,001$). Die unbehandelten, zum Vergleich herangezogenen Eizellen einer dritten Gruppe hatten sich zu 88 % weiterentwickelt (WILMUT, 1972).

Die Schädwirkung des DMSO ist nicht nur durch seine stark dehydrierende Eigenschaft bei direkter Zugabe zu den Eizellen bedingt (WHITTINGHAM und WALES, 1969; WILMUT, 1972), sondern gleichzeitig von der Dauer seines Kontaktes mit den Zellen abhängig. Auch nach Ausschaltung des heftigen osmotischen Effekts (schrittweise Zugabe der Schutzsubstanz bis zur Endkonzentration) verringerte sich die Überlebenschance der Eizellen nach längerem Kontakt mit DMSO bei einer Temperatur von + 20° C (WILMUT, 1972).

Angaben über die Länge der Zeit und die verwendeten Konzentrationen fehlen. Fest steht jedenfalls, daß Eizellen nach schrittweiser Zugabe von DMSO bis zu 1 molarer Endkonzentration keinen Schaden erleiden, wenn sie bis zu 18 Minuten in + 20° C warmem Medium lagern (WHITTINGHAM und Mitarbeiter, 1972).

Die schützende Wirkung des Glycerins bei der Gefrierkonservierung von Geflügelsperma entdeckten POLGE und Mitarbeiter (1949) und gaben damit auch den Anstoß zu wei-

teren Untersuchungen über andere Schutzsubstanzen. LOVELOCK (1954b) stellte fest, daß die Salzkonzentration bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt in Anwesenheit von Glycerin stark verringert wird ("Pufferwirkung"). Da die Elektrolyte auch innerhalb der Zelle konzentriert werden, muß die Schutzsubstanz folglich auch dort vorhanden sein. Diese Erkenntnis veranlaßte LOVELOCK zu der Behauptung, daß nur in die Zelle eindringende Substanzen zur Verhinderung von Gefrierschäden geeignet seien. Die generelle Gültigkeit dieser Forderungen wurde widerlegt, als es gelang, unbefruchtete Mäuseeier ohne Schäden einzufrieren. Zwar fand auch hier Glycerin Verwendung, konnte jedoch durch die spezielle Versuchsanordnung nachweislich nicht in die Zelle eindringen. War aber in einem anderen Versuch das Glycerin vor dem Einfrieren in die Zellen gelangt, zeigten diese nach dem Auftauen strukturelle Veränderungen (SHERMAN, 1963). Als Angriffspunkt des Glycerins sieht SHERMAN (1964) den extrazellulären Raum und betrachtet die Dehydrierung durch diese Substanz vor dem Einfrieren als Voraussetzung für den Schutz. Die weitere Abgabe von Wasser aus der Zelle tritt dann während des Gefriervorgangs ein. Diese grundsätzlich unterschiedlichen Aussagen beider Autoren stehen nur scheinbar im Gegensatz zueinander, denn die Untersuchungen an Zellen verschiedener Art zeigen, daß jede dieser Theorien einen bestimmten Gültigkeitsbereich besitzt.

LOVELOCK und BISHOP (1959), ASHWOOD-SMITH (1961) und DOUGHERTY (1962) froren rote Blutkörperchen, Rinderspermien bzw. Knochenmarkszellen und Fibroblasten sowie Nierenzellen im Beisein von DMSO erfolgreich ein. DMSO dringt wegen seines geringen Molekulargewichts schneller durch die Zellmembranen als Glycerin. Den deutlichsten Beweis für die Gültigkeit beider Theorien erbrachten PERSIDSKY und RICHARDS (1963): Knochenmarkszellen wurden einmal in Anwesenheit von PVP, zum anderen im Beisein von DMSO tiefgefroren, wobei unter Verwendung des Polymers größere Überlebensraten nach dem Auftauen zu erzielen waren.

Die Aussagen von SHERMAN (1964) wiederum konnten bestätigt werden, als es gelang, befruchtete Mäuseeizellen mit großem Erfolg einzufrieren, ohne daß die verwendeten Schutzsubstanzen PVP und DMSO ins Zellinnere gelangen konnten (WHITTINGHAM, 1971a; WHITTINGHAM und Mitarbeiter, 1972; WHITTINGHAM und WHITTEN, 1974).

Die Art der Schutzwirkung des Glyzerins vermutete LOVELOCK (1954 b) in seiner Fähigkeit, Elektrolytkonzentrationen abzupuffern.

MERYMAN (1956) und SHERMAN (1964) nahmen an, daß Glyzerin den Gefrierpunkt erniedrigt und durch Bindung von Wasser die Eismenge bei einer bestimmten Temperatur verringert. Damit steht den Salzen gleichzeitig eine größere Menge Lösungswasser zur Verfügung.

In einer Studie über die Wirkung von PVP und Glyzerin konnte die Puffertheorie letztendlich bewiesen werden. Diese Substanzen "besitzen die physikalische Fähigkeit, die Temperatur zu erniedrigen, bei der eine bestimmte molare Menge von Natriumchlorid bei Eisbildung vorhanden ist" (FARRANT, 1969).

Das Vermögen von DMSO durch Bindung von Wasser ($\text{DMSO} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$) bis zu Temperaturen von etwa -70°C flüssig zu bleiben (RASMUSSEN und MACKENZIE, 1968), gibt der Substanz im Prinzip die Wirkungsbasis, die auch PVP und Glyzerin besitzen.

Eine ergänzende Betrachtung hinsichtlich der Schutzwirkung führt in den Bereich der molekularen Struktur des Wassers und der Gefrierschutzsubstanz.

Zur vollständigen Löslichkeit in Wasser muß eine Substanz die Wasserstoffbindungen der H_2O -Moleküle untereinander aufreißen und durch äquivalente eigene ersetzen. Da DMSO diese Voraussetzung erfüllt, ist damit die molekulare Spezifität als Schutzsubstanz gegeben. Dimethylsulfon ist ein sehr viel schlechterer H-Bindungsbildner und nicht in der Lage, rote Blutkörperchen vor Gefrierschäden zu bewahren.

"Wachstum von Eis in wässrigen Lösungen im Supercoolingbereich wird durch Schutzsubstanzen deutlich verzögert" (DOEBBLER, 1966). Diese Tatsache scheint ebenfalls im Zusammenhang mit dem H-Bindungsvermögen zu stehen. Je mehr Bindungsgruppen in einer Lösung enthalten sind, desto deutlicher ist die Eiswachstumsrate verringert.

2.4. Transplantation von Mäuseeizellen

Bei dem Ziel, kältekonservierte, befruchtete Säugereizellen in beliebiger Anzahl zu reaktivieren und so eine ideale Basis für die ständige, nicht ortsgebundene Verfügbarkeit wertvollen genetischen Materials schaffen zu können, ist die erfolgreiche Transplantation das Endglied in der Kette der Manipulationen. Die Entwicklung lebensfähiger Feten ist der schlüssige Beweis dafür, daß den Eizellen durch vorausgegangene experimentelle Belastungen kein Schaden entstanden ist.

2.4.1. Grundvoraussetzungen

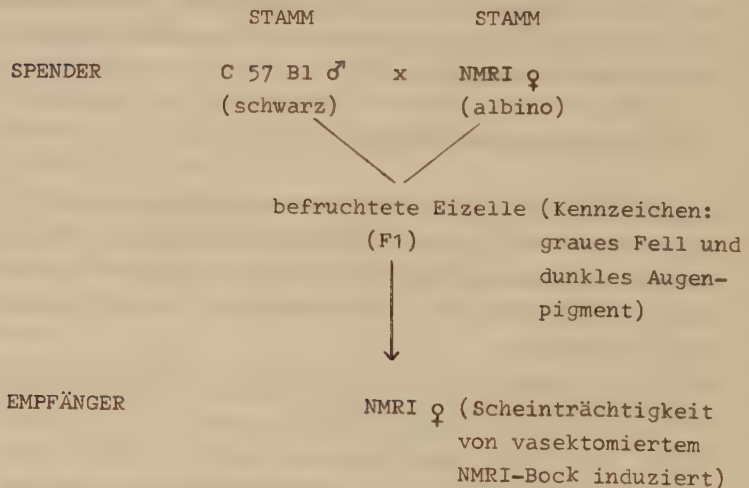
Für das bessere Verständnis und zur Vermeidung von Unübersichtlichkeit in der Darstellung sollen allgemein gültige Voraussetzungen an den Anfang gestellt werden. Dazu ist es nötig, auf die Vorbereitung der Empfänger-tiere einzugehen.

In diesem Zusammenhang wird vorerst auf Begründungen oder nähere Erläuterungen verzichtet.

Um der transplantierten Eizelle die Umgebung für ihre optimale Weiterentwicklung anbieten zu können, muß sie ein ihrem Entwicklungsstadium entsprechendes Milieu vorfinden. Zu diesem Zweck werden Spender- und Ammentiere in eine mehr oder weniger synchrone Trächtigkeitsphase gebracht. Das geschieht einmal durch die gesteuerte, hormoninduzierte Ovulation der Empfänger und deren anschließende Kopulation mit fertilen oder vasktomierten (Scheinträchtigkeit bedingenden) Böcken. Zum anderen werden auch

(schein-) trächtige Tiere aus zufälliger Paarung verwendet. Wenn nicht besonders darauf hingewiesen wird, ist die (Schein-) Trächtigkeitsphase in Tagen nach Kopulation (n.K.) angegeben. Die an erster Stelle genannte Zahl bezeichnet die Phase des Spenders oder das Alter seiner Eizellen in Tagen. Die zweite Angabe bezieht sich auf den Empfänger und läßt damit den Grad der Synchronisierung erkennen (z. B. 3,5/3,5, 3,5/2,5 oder 2,5/3,5).

Die Identifizierung der aus erfolgreicher Transplantation hervorgegangenen Feten bzw. lebenden Jungtiere geschieht in allen einschlägigen Untersuchungen durch bestimmte Kreuzungen, die genetische Markierungen erlauben, die phänotypisch zu erkennen sind. Folgende Übersicht zeigt eine von vielen Möglichkeiten.



Bringt das Empfängertier (NMRI) Junge mit dunkel pigmentierten Augen zur Welt oder lassen die Feten bei vorzeitiger Autopsie dunkle Augenfarbe erkennen, so sind die aus der Spenderpaarung hervorgegangenen Zygoten (C 57 B1 x NMRI) erfolgreich transplantiert worden. Ab dem 12. Tag der Trächtigkeit ist die Augenfarbe der Feten erkennbar (RUNNER und PALM, 1953).

Die vorzeitige Tötung der Ammentiere gegen Ende der 19 bis 21 Tage dauernden Trächtigkeit (JUNG, 1958) empfiehlt sich deshalb, weil die Muttertiere ihre Jungen oft gleich nach der Geburt fressen (RAFFERTY, 1970).

Die bei der blutigen Methode notwendige Eröffnung der Bauchhöhle in Form einer dorsolateralen Incision setzt die Narkose während der Eizellübertragung voraus. Dazu eignen sich Mittel wie Äther (MCLAREN und MICHIE, 1956; TARKOWSKI, 1959) und Barbiturate in Form des Pentobarbital-Natriums in der Dosierung von 60 mg pro kg Körpergewicht intraperitoneal. Eine antibiotische Versorgung der operierten Tiere ist wegen ihrer großen Widerstandsfähigkeit gegen infektiöse Noxen nicht erforderlich (SIMMONS und BRICK, 1970; RAFFERTY, 1970).

Nach erfolgreichem Eingriff genügt der alleinige Verschluss der Hautwunde. Die durchtrennte Muskulatur wächst ohne Komplikationen rasch wieder zusammen (MCLAREN und MICHIE, 1956; RAFFERTY, 1970).

Ein Grund für die in der Mehrzahl der Fälle nur einseitig durchgeführte Eizellübertragung wird von keinem Autor angegeben.

Zur Vasektomie und zum späteren Einsatz bei Induzierung der Scheinträchtigkeit eignen sich 12 Wochen bis 1 Jahr alte Böcke. Unter Narkose wird das Skrotum in seiner Mittellinie eröffnet, ein Hoden mit dem zugehörigen Ductus deferens nach außen verlagert und der Samenleiter an zwei möglichst weit auseinanderliegenden Stellen durchtrennt. Eine zusätzliche Ligatur erübrigt sich. Entsprechend verfährt man mit dem Samenleiter der anderen Seite, wiederum von der gleichen Incisionsstelle am Skrotum ausgehend (RAFFERTY, 1970). Sterile Böcke sind notwendig, weil sich die Entwicklung von Eizellen der Empfängertiere störend auf übertragene Eizellen auswirkt (TARKOWSKI, 1959; RAFFERTY, 1970). Eine Erklärung dafür wird nicht gegeben.

Bewiesen ist, daß mit größer werdender Menge von Eizellen die Verluste während ihrer Teilung zunehmen (ALLEN und MCLAREN, 1971). Bei der Implantation selbst dürfte diese

Art Konkurrenz keine Rolle spielen. Der Anteil der Blastozysten, die sich nach Transplantation implantieren ist unabhängig von ihrer Anzahl. Bis zu 30 Eizellen wurden in ein Uterushorn übertragen (MCLAREN und MICHIE, 1959). Ist die Einnistung in die Uterusschleimhaut auch nicht durch eine übermäßige "Eizellendichte" gestört, so ist doch die Absterberate während des beginnenden Wachstums deutlich erhöht. Diese Tatsache ist vermutlich die Folge einer Erschöpfung der Versorgungskapazität (MCLAREN und MICHIE, 1956).

2.4.2. Methoden der Übertragung

2.4.2.1. Unblutig

In Anlehnung an die Technik der künstlichen Rinderbesamung ist die Eizellübertragung bei der Maus via Cervix versucht worden. Zellen im Morula- und Blastozystenstadium, 2 bis 3,5 Tage n.K., wurden auf Empfängertiere übertragen, die bereits 2 bis 3,5 Tage trächtig oder scheinträchtig waren. Bei Durchführung der Transplantation von vier bis sechs Eiern in jeweils ein Uterushorn fanden alle möglichen Zeitkombinationen Verwendung. Von insgesamt 59 Eizellen entwickelten sich 5 (8,4 %) zu lebensfähigen Jungtieren. Die "Inovulation" von 1- und 2-Zellstadien auf zeitentsprechend vorbereitete Ammen blieb ohne Erfolg (BEATTY, 1951).

Die gleichen Ergebnisse erbrachten erneute Versuche mit 2-Zell- und Blastozystenstadien. Kein inovulierter 2-Zeller konnte sich implantieren (Autopsie am 4. bis 7. Tag n.K.), wohingegen 8,4 % der Blastozysten zu normalen Feten heranwuchsen (Autopsie 11. bis 19. Tag). Im Unterschied zu BEATTY (1951) waren Spender und scheinträchtige Empfänger exakt synchronisiert (1,5/1,5 bzw. 3,5/3,5). Die Beobachtung, daß der Uterus die Eizellen unmittelbar nach der Übertragung wieder ausstieß, ist die Ursache für den geringen Erfolg und der Grund für den Ausschluß dieser Methode (TARKOWSKI, 1959).

2.4.2.2. Blutig

Über erste Erfolge bei der Transplantation von Mäuseeiern auf dem Weg der dorsolateralen Incision berichtet RUNNER (1951). Unbefruchtete Eier und Zygoten superovulierter, adulter Spender übertrug er kurz nach dem Eisprung bzw. nach ihrer Befruchtung auf Empfänger, deren spontane Ovulation gerade ablief. 2 Stunden vor dem Transfer in die allseitig zur Bauchhöhle hin abgeschlossene Ovarialkapsel (HAFEZ und BLANDAU, 1969) war die Paarung der Ammen mit sterilen Böcken erfolgt. Als Instrument diente dabei eine Kapillarpipette, die eine nicht genannte Zahl von Eiern enthielt. 20 % der übertragenen Eizellen hatten sich am Tag der Autopsie (18. Tag) zu normalen Feten entwickelt.

Die wenig später durchgeführten Untersuchungen erbrachten mit 14,2 % Feten einen geringen Erfolg. Da hier bis auf die Herkunft der Spendereizellen die gleichen Grundvoraussetzungen vorlagen, vermutete man die Ursache in der verminderten Entwicklungskapazität superovulierter Eizellen nicht geschlechtsreifer Tiere (RUNNER und PALM, 1953).

Die statistische Überprüfung der unterschiedlichen Ergebnisse beider Arbeiten zeigte aber, daß die Differenz nicht signifikant war (MCLAREN und MICHIE, 1956).

Bei der Transplantation können vermutlich drei Faktoren das Überleben der Eizellen beeinflussen: die relativen Trächtigkeitsstadien post coitum von Spender und Empfänger, die sexuelle Reife oder Unreife des Spenders und das Operationstrauma des Empfängers. Synchrone und asynchrone Eiübertragungen wurden mit Spendern und Empfängern in der Trächtigkeitsphase 2,5 oder 3,5 n.K. durchgeführt, wobei man die vier Kombinationsmöglichkeiten auf ihre Tauglichkeit hin überprüfte. Dabei stellte sich heraus, daß beste Ergebnisse mit 3,5/2,5 n.K. zu erzielen waren (eine Diskussion über den Grund hierfür fehlt). 22 % der Eizellen hatten sich am 16. und am 17. Tag n.K. zu normalen Feten entwickelt.

Eine unterschiedliche Eignung hinsichtlich des Spenderalters bestand nicht, und es war gleichgültig ob die Empfängertiere trächtig oder scheinträchtig waren. Das Operationstrauma führte in keinem Falle zum Abbruch der Gravidität. War aber die Manipulation am Uterushorn bei Injektion der Eier zu "grob", sank die Erfolgsquote um ein Drittel. Die Eiübertragung selbst erfolgte durch eine Punktionsstelle nahe der linken Uterushornspitze. Dazu führte man eine schmale Kanüle (Außendurchmesser 0,47 mm) vorsichtig in Richtung auf die Bifurkation ein und entleerte deren Inhalt (MCLAREN und MICHIE, 1956). Das jeweilige Stadium der Eizellen blieb zwar ungenannt, doch die Angaben 2,5/3,5 n.K. lassen erkennen (siehe Tabelle 3), daß es sich um Morulae oder Blastozysten handelte.

Erst einige Jahre später fand man die Erklärung für die Notwendigkeit einer asynchronen Übertragung. Eine hohe Anzahl (70 %) der 2-Zell-Stadien, die mit Hilfe einer Pipette durch die Ovarialkapsel in das Infundibulum eines der Eileiter scheinträchtiger Tiere "eingeblassen" worden waren, implantierten sich und wuchsen bis zur Tötung der Ammen am 15. bis 19. Tag n.K. zu normalen Feten heran oder wurden am 19. Tag geboren. Die Phasen von Spender und Empfänger waren 1,5/1,5 n.K. Die verwendeten Eizellen entstammten spontaner Ovulation. In zwei weiteren Versuchen sind nach dem gleichen Prinzip sogar 8-Zeller bzw. Blastozysten, die in einem Phasenunterschied von 2 bzw. 3 Tagen zum Empfänger (0,5 Tag n.K.) standen, in deren Eileiter übertragen worden. Bis zum 19. Tag hatten sich alle 8-Zell-Stadien (4 von 4) und 37,5 % der Blastozysten (3 von 8) weiterentwickelt. Die Anzahl der jeweils transferierten, befruchteten Eizellen schwankte von 3 bis 8. Die Tatsache, daß diese in bezug auf die Empfängerphase älteren, in zwei Fällen sogar sehr viel älteren Zellstadien zu normalen Feten heranwuchsen, ist durch den sogenannten Transplantationsschock erklärbar. In einer Reihe von Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die übertragenen Eier am 3. Tag ihrer Entwicklung, hier erreichen

sie normalerweise das 8-Zell-Stadium, sich noch im 4-Zell-Stadium befanden. Aus diesem Grund sind Blastozysten auch erst nach dem 4. Tag ihrer Entwicklung im Geschlechts- trakt auffindbar. Es wird angenommen, daß die Zellen durch ihren Transfer etwa 0,5 bis 1 Tag einem Teilungs- stopp unterliegen. Das erst macht deutlich, warum die Asynchronisierung erforderlich ist. "Läuft" der Empfänger- uterus dem Spenderei in der Entwicklung "davon", was schon bei Phasengleichheit zu erwarten ist, geht die Zelle zugrunde. Die geringeren Überlebenschancen in den Uterus eingebrachter Blastozysten (MCLAREN und MICHIE, 1956), ist die Folge der durch den Transplantationsschock herbeigeführten "Implantationsschwäche". Jüngere Eizellen stehen der Einnistung in das Endometrium zeitlich weniger nah und sind davon nicht betroffen.

Die in den Eileiter übertragenen, relativ "alten" 8-Zel- ler bzw. Blastozysten entwickeln sich weiter bzw. können dort ohne Entwicklung verharren und treten dann in den Uterus ein, wenn dieser zur normalen Zeit implantations- bereit ist. Die physiologische Trächtigkeitsdauer ist da- mit um zwei bzw. drei Tage verlängert. Das gleiche Phäno- men beobachtet man bei der verlängerten Tragezeit weibli- cher Tiere, die noch ihre Jungen des vorausgegangenen Wurfes säugen (TARKOWSKI, 1959).

Die neueste Information über den direkten Transfer von Mäuseeiern stammt von GOSDEN (1974). Er berichtet über die Entwicklungschance übertragener Zellen in Abhängig- keit des Alters von Spender und Empfänger. 38 % und 41 % der transplantierten Eizellen (40 und 39) entwickelten sich bis zum Tag 19 n.K. (Tag 1 ist der Tag der (Schein-) Trächtigkeit, an dem der Ejakulationspfropf in der Schei- de gefunden wird. Die Kontrolle erfolgt jeweils morgens.) zu lebensfähigen Jungtieren. Spender und Empfänger waren alte (10 bis 16 Monate) oder junge (2 bis 4 Monate) Tie- re. Von den vier Möglichkeiten erwies sich die Überle- genheit der Kombination "jung - jung" (38 %) und "alt - jung" (41 %). Die verminderte Reproduktionsfähigkeit

alternder Tiere ist nach den Aussagen des Autors durch die Verluste um die Zeit der Implantation bedingt, nicht aber auf die Ausstoßung minderwertiger Eizellen zurückzuführen. Spender und Empfänger wurden zufällig gepaart, ihre Phasendifferenz bei Übertragung der Blastozysten in beide Uterushörner betrug einen Tag (3,5/2,5 n.K.).

Bei einem Ausblick auf die Optimierung der Transplantationserfolge sieht man die Möglichkeit, Überlebensraten bis zu 50 % im Mittel zu erzielen. Dazu sind der Verlust von Eiern im Moment ihrer Übertragung und die mechanische Schädigung der Reproduktivorgane durch intensive Übung sowie geeignetes Instrumentarium gering zu halten (MCLAREN und MICHIE, 1956).

An den bisher zitierten Arbeiten und den darin enthaltenen Informationen orientierten sich alle späteren Autoren. Meist stand nicht mehr die Transplantation allein im Vordergrund, sondern als notwendiges Beweismittel im Zusammenhang mit Untersuchungen, die den Einfluß der in-vitro-Manipulation auf die Eizelle klären sollten. Daraus folgt, daß in diesen Fällen die unmittelbare Übertragung von Tier zu Tier keine Rolle mehr spielte. Zudem wurden in jedem Fall adulte Tiere (Spender und Empfänger) verwendet, deren Zyklen durch induzierte Ovulation asynchron aufeinander abgestimmt waren.

Aus 672 nach der Methode von MCLAREN und MICHIE transplantierten Blastozysten (4/2,5 bis 3,5 n. Ovulation) entwickelten sich 6,1 % bis zur Geburt oder Autopsie am 17. Tag. Der Übertragung von jeweils 6 Zellen in das linke Uterushorn ging ein in-vitro-Aufenthalt von 72 Stunden in einem chemisch definierten Medium voraus (siehe Tabelle 2). Als Empfänger dienten juvenile Tiere im Alter von 6 bis 8 Wochen (BIGGERS und Mitarbeiter, 1965).

Ähnliche Ergebnisse (6,7 %) erbrachten Versuche, bei denen man 2-Zeller bis zum Blastozystenstadium in explantierten Ampullen aufbewahrte. Die erste Teilung der gewonnenen Zygoten war nach 24-stündiger Lagerung in Krebs-

Ringer-Lösung erfolgt. Hier verwendete man ebenfalls die Kombination 4/2,5 n. Ovulation und übertrug 7 Zellen in jeweils nur 1 Uterushorn juveniler Ammen, die am 17. Tag getötet wurden (WHITTINGHAM und BIGGERS, 1967).

Auch der in-vitro-Befruchtung von Mäuseeizellen schloß sich die Transplantation der daraus hervorgegangenen 2-Zeller an. Den am Tag 1 der Scheinträchtigkeit insgesamt 30 injizierten Eizellen (10 pro linke Ampulle) entstammten 9 Feten (WHITTINGHAM, 1968). Die genauen Phasenunterschiede bei Transplantationen sind nicht genannt, und in den nachfolgend zitierten Arbeiten beschränkt man sich auf die Angabe des Zellstadiums und des Tages der Scheinträchtigkeit (Tag 1, Tag 2, usw.).

Das Alter der adulten Empfänger wird von keinem der beiden letztgenannten Autoren angegeben. Ob die Tiere noch juvenil oder vorher bereits einmal bzw. mehrmals tragend gewesen sind, bleibt ebenfalls unklar.

Den vorausgegangenen Schilderungen über die Konservierung befruchteter Säugereizellen (siehe 2.1.2.) ist zu entnehmen, daß man in der Lage ist, genetisches Material erfolgreich über längere Zeit bei extrem niedrigen Temperaturen aufzubewahren. Will man die sich damit anbietenden Möglichkeiten voll ausschöpfen, muß der Weg der Rücktransplantation beschriftet werden.

WHITTINGHAM (1971a) transplantierte 8-Zeller und Blastozysten, die 30 Minuten bei -79°C gelagert worden waren, in Eileiter (nach TARKOWSKI) und Uterus (nach MCLAREN und MICHIE) scheinträchtiger Tiere. Der Transfer der jüngeren Stadien war mit vier voll entwickelten Früchten aus 19 injizierten Zellen (21,1 %) weit weniger erfolgreich als der der 13 älteren (69,2 %). Die jungen Blastozysten waren nach dem Auftauen noch weitere 24 Stunden im Brutschrank kultiviert worden. Die operativen Eingriffe fanden am Tag 1 bzw. am Tag 3 der Scheinträchtigkeit statt. Jeweils 6 bis 7 Zellen wurden einseitig übertragen und die Autopsien am Tag 18 vorgenommen. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu der Aussage TARKOWSKI'S, der den

Blastozysten geringere Erfolgchancen einräumte.

Die umfangreichste Untersuchung über die Transplantation befruchteter Mäuseeizellen verschiedener Stadien (1-Zeller, 2-Zeller, 8-Zeller, Blastozysten) nach unterschiedlich langem Aufenthalt bei -79°C , -196°C oder -269°C stammt von WHITTINGHAM und Mitarbeitern (1972). Einmal übertrug man die Zellen gleich nach dem Auftauen, zum anderen erst nach ihrer Entwicklung zu Blastozysten *in vitro*. Insgesamt 65 % der Empfänger wurden trächtig, was für juvenile Tiere normal ist. 43 % der auf diese Tiere übertragenen Eizellen entwickeln sich entweder zu "lebenden Feten" oder augenscheinlich normalen Neugeborenen. Von der Summe aller transplantierten Zellen (958) ausgehend, beträgt der entsprechende Prozentsatz 28,5.

Interessant in diesem Zusammenhang scheint die Tatsache, daß auch 8-Zeller mit einem oder mehreren degenerierten Blastomeren entwicklungsfähig sind. Die Transplantation erfolgte bei den Blastozysten nach dem Beispiel von MCLAREN und MICHIE (1956), bei 1-, 2- und 8-Zellern nach TARKOWSKI (1959), im ersten Fall am Tag 3, im zweiten am Tag 1 der Scheinträchtigkeit der Ammen. Alle Empfänger hatten spontan ovuliert. Die Autoren gaben nicht an, ob der Transfer ein- oder beidseitig erfolgt ist.

Über eine Erfolgsquote von 50,8 % berichten zwei Jahre später WHITTINGHAM und WHITTEN (1974). Sie konservierten 8-Zeller bis zu 222 Tage bei -196°C , hielten dann die Eizellen 24 Stunden bis zur Blastozyste im Brutschrank und transplantierten sie anschließend in der mehrfach zitierten Weise.

Die Effektivität des Gesamtsystems: Superovulation, Gewinnung - Kultivierung - Gefrierkonservierung und Transplantation, wird erst dann voll erkennbar, wenn die Zahl der sich weiterentwickelnden Blastozysten oder der lebenden Nachkommen auf die Anzahl gewonnener Eizellen bezogen wird. Je weniger im Verlauf der Manipulation verlorengelassen oder zerstört werden, desto besser ist die Methode. Bei der kritischen Durchsicht der Literatur ist zu be-

rücksichtigen, daß Erfolgsraten von 50 oder 70 % häufig nur bezogen sind auf das Ergebnis eines Abschnittes des Gesamtprozesses Einfrieren/Auftauen, Kultivierung und Transplantation. Über die Erfolgchancen von der Gewinnung der Eizellen bis zu den lebenden Nachkommen aus der Transplantation liegen keine Angaben vor.

2.5. Der Einfluß niedriger Temperaturen auf die genetische Substanz der Zelle

Die Möglichkeit der Veränderung genetischer Information ist seit langem bekannt. Von der spontanen Mutation abgesehen, kann das Erbmateriale auch durch ionisierende Strahlung, UV-Strahlung und chemische Substanzen willkürlich negativ beeinflusst werden. Dadurch lassen sich im submikroskopischen Bereich einzelner Gene und/oder in optisch erfaßbarer Form an Chromosomen Veränderungen herbeiführen. Zu den Mutationen der 2. Kategorie gehören strukturelle oder numerische Abnormitäten (LEVINE, 1962). Kann man die genetische Substanz in der oben genannten Art manipulieren, so ist die Vermutung naheliegend, daß niedrige Temperaturen bzw. die Energiezufuhr beim Auftauen ähnliche Wirkungen auf die lebende Zelle ausüben.

Tatsächlich gelang der Nachweis, daß an den Chromosomen menschlicher Zellen Schäden entstanden, wenn sie drei Tage bei $+3^{\circ}\text{C}$ gelagert worden waren. Während die Chromosomen der Kontrollen sich gleichmäßig anfärben ließen, zeigten die der kältebehandelten Gruppe unterschiedliche Farbintensität in regelmäßigen Abständen über ihre gesamte Armlänge. Die Orte geringer Färbung wurden als Einschnürungen (Konstriktionen) bezeichnet. Infolge gewisser Reaktionen während des Aufenthaltes bei der genannten Temperatur hatte sich das Erbmateriale an diesen Stellen "verdünnt" und neigte dort gleichzeitig zu erhöhter Bruchbereitschaft. In mehreren Chromosomendarstellungen konnte der Verlust herausgebrochener Stücke (Deletionen) gezeigt werden. Mit dem Hinweis auf bestimmte Vorgänge in

der Zelle suchen die Autoren nach Folgen indirekter Kälteschäden. Da in dem Bereich von $+3^{\circ}\text{C}$ nur noch wenige Stoffwechselprozesse ablaufen, können einerseits die Verminderung sowie andererseits die Akkumulation bestimmter Metaboliten die Chromosomenreproduktion negativ beeinträchtigen (HAMPEL und LEVAN, 1964). Ein direkter Einfluß der Kälte wird nicht beschrieben.

In Versuchen mit Kaninchenzelllinien, die 25 Tage bei $+3^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt worden waren, ließen sich jedoch keinerlei morphologische Veränderungen an den Chromosomen nachweisen (OLSSON und MELANDER, 1966).

Anhand von Chromosomenanalysen aus Kanincheneizellen, die mit unterschiedlich lang bei -196°C gelagertem Sperma befruchtet worden waren, konnte man Verkürzungen der Chromatiden nachweisen. Die Häufigkeit mit der diese Erscheinungen beobachtet wurden, war abhängig von dem Lagerungszeitraum (5 Std., 5 Tage, 1 Jahr). Je länger die Spermakonservierung dauerte, desto weniger oft beobachtete man eine Verkürzung. "Deutlich sichtbare Deletionen, stark ungleiche Arme und Konstriktionen traten nur vereinzelt auf. Eine Abhängigkeit von der Tiefgefrierung ließ sich nicht feststellen". Die Tatsache, daß länger gefrorenes Sperma weniger häufig Chromosomenveränderungen bewirkte, ist durch den selektiven Tod der schon beim Einfrieren vorgeschädigten Zellen im Verlauf ihrer Aufbewahrung erklärbar. Am 5. Tag der Konservierung besitzen diese Spermien noch ihre Befruchtungsfähigkeit und tragen die geschädigte Erbsubstanz mit in die Eizelle (MAURER und Mitarbeiter, 1974). Die Messung der Armlängen erfolgte mit einem speziell dafür entwickelten Koordinatenmeßtisch (STRANZINGER und Mitarbeiter, 1970), und die Analyse der Daten wurde durch ein Computerprogramm erstellt (GELDERMANN und Mitarbeiter, 1970).

2.6. Chromosomen und ihre Darstellung

Die genetische Information eines Lebewesens ist auf bestimmten Zellkernelementen, den Chromosomen, verankert. In der normalen Körperzelle (somatische Zelle) ist jedes Chromosom durch die Verschmelzung mütterlicher und väterlicher Gameten (haploider Satz) zweimal vertreten. Eine Ausnahme bilden dabei die Geschlechtschromosomen der männlichen Tiere, die als XY-"Paar" vorliegen.

Während des Vorgangs der mitotischen Teilung wird das Erbmateriale verdoppelt und gleichmäßig auf die zwei entstehenden Tochterzellen verteilt. Die Verdoppelung geschieht durch Längsspaltung der Chromosomen (identische Reduplikation), wobei die Chromatiden (Tochterchromosomen) entstehen, die zunächst noch von dem sich erst in der Anaphase teilenden Zentromer zusammengehalten werden. Durch diese Art der Informationsweitergabe ist die Kontinuität des diploiden Chromosomensatzes ($2n$) gewährleistet. Die Zahl $2n$ selbst variiert innerhalb der Tierarten. So haben beispielsweise der Hund (*Canis lupus*) 78 und das Schwein (*Sus scrofa*) 38 Chromosomen. Eine Typisierung der Chromosomen bietet sich durch die unterschiedliche Lage des Zentromers an. Liegt es ganz am Ende des Chromosoms, heißt es telozentrisch, befindet es sich ganz in der Nähe eines Endes, nennt man es akrozentrisch. Metazentrisch bzw. submetazentrische Chromosomen besitzen ein genau bzw. nahezu mittelständiges Zentromer.

Zu Beginn der Mitose (Prophase) sind die Chromosomen noch kaum zu erkennen, haben sich aber in dem folgenden Stadium der Metaphase maximal kontrahiert und treten deutlich sichtbar hervor. Nur in diesem Zustand gelingt ihre Identifizierung (HOFFMANN, 1967).

Um eine möglichst große Anzahl von Metaphasen auswerten zu können, verwendete man das Mitostatikum Kolchizin (TJIO und LEVAN, 1956). Dabei wird die Mitose in der Metaphase gestoppt, ohne daß der Eintritt in die Zellteilung

gestört ist. Durch diesen Eingriff kommt es zu einer Anhäufung von Metaphasen.

Das Kolchizin verstärkt zudem noch die Kontraktion und Separation der Chromatiden, wodurch ihre Darstellung verbessert wird (MCFEELY, 1966).

Zur Vermeidung von Überlagerungen infolge schlechter Ausbreitung der Chromosomen führten HSU und POMERAT (1952) die hypotonische Behandlung der Zellen ein. Die eindringende Flüssigkeit läßt die zu untersuchenden Objekte quellen und begünstigt die Verteilung des Erbmaterials während der sich anschließenden Fixation. Als hypotonische Lösungen werden 1 %iges Na-Zitrat, Aqua dest., 0,17 bis 0,29 %iges NaCl und Serumverdünnungen eingesetzt. Das Na-Zitrat ist die meistverwendete Substanz (HOFFMANN, 1967).

Die Chromosomenfixation geschieht in der Mehrzahl der Fälle mit einer Mischung aus Eisessig und Methanol (Äthanol) im Verhältnis 1 : 3 (MCFEELY, 1966; TARKOWSKI, 1966; WROBLEWSKA, 1969; MCLAREN, 1972).

Die Färbung der Chromosomen kann mit allen Stoffen durchgeführt werden, die eine Affinität zum Kernmaterial besitzen (Karbolfuchsin, Giemsa, Orcein, Feulgen). Dabei hat sich Orcein in 2 %iger Lösung am besten bewährt (HOFFMANN, 1967).

2.7. Chromosomenanalyse an befruchteten Mäuse- und Schweineeizellen

Frühembryonale Resorptionen und Spontanaborte sind mitunter die Folge von Chromosomenaberrationen. Diese Tatsache macht es notwendig, praeimplantäre Stadien befruchteter Eizellen auf chromosomale Abnormitäten hin zu untersuchen (MCFEELY, 1966). Je älter eine Eizelle ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, mehrere Metaphasen auf einmal fixieren zu können. Die Teilungen der Blastomeren folgen, wie schon erwähnt, in immer kürzeren Abständen aufeinander und erzeugen eine schnell ansteigende Zahl von Zellen. Mit Hilfe des Mitosestoppers

Kolchizin läßt sich die Ausbeute der Metaphasen noch steigern.

Das Chromosomenkomplement der europäischen Hausmaus (*Mus musculus*) hat 40 Chromosomen, die vom Typ her akrozentrischen Aufbau besitzen. Diese Voraussetzungen gelten auch für die Laboratoriumsmäuse der unterschiedlichen Stämme (GROPP und Mitarbeiter, 1969).

Grundsätzlich ist es möglich, die Chromosomenanalyse an allen befruchteten Mäuseeizellen durchzuführen. Die Applikation des Mitosehemmers muß kurz vor dem angenommenen Zeitpunkt der Teilung erfolgen. Bei der Vielzahl der Zellen einer Blastozyste ist dieser Umstand weit weniger wichtig als bei einer Zygote.

Die Aufarbeitung befruchteter Mäuseeizellen verläuft nach dem von TARKOWSKI (1966) ausführlich beschriebenen Verfahren. Das Kolchizin wird den Spendertieren 1,5 Stunden vor der Eigewinnung intraperitoneal injiziert.

Analog zu dieser Technik kann der Mitosestopper auch *in vitro* eingesetzt werden (MCFEELY, 1966). Der Autor hat dadurch eine Methode aufgezeigt, den Einfluß der Kultivierung bzw. der Medien auf die Zellteilung und Chromosomen zu untersuchen.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methode

3.1.1. Kulturmedien und deren Vorbereitung

Die beiden Medien Dulbecco's phosphate-buffered salt solution (PBS) und Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung (KRBL) fanden während der gesamten Versuchsdauer Verwendung. Ihre Zusammensetzung geht aus der Tabelle 4 hervor.

Während die anorganischen Bestandteile von PBS mit den getrennten Komponenten A und B gebrauchsfertig angeboten werden (Serva), waren die Salze der KRB-Lösung und alle organischen Verbindungen einzeln abzuwiegen. Die anschließende Auflösung in entionisiertem Wasser (Widerstand $> 7 \cdot 10^5$ Ohm) geschah folgendermaßen:

PBS

Lösung a	Komponenten A	+ H ₂ O ad	449 ml
Lösung b	Komponenten B	+ H ₂ O ad	449 ml
Lösung c	organ. Bestandteile (außer Penicillin)	+ H ₂ O ad	99 ml
Lösung d	Penicillin (Pen.)	+ (steriles) H ₂ O ad	3 ml
insgesamt			1.000 ml

KRBL

Lösung e	die 6 anorgan. Komponenten einzeln je + H ₂ O ad 100 ml; zusammen:		600 ml
Lösung f	organ. Bestandteile (außer Penicillin und Streptomycin)	+ H ₂ O ad	98 ml
Lösung g	Penicillin	+ (steriles) H ₂ O ad	2 ml
Lösung h	Streptomycin (Strept.)	+ (steriles) H ₂ O ad	2 ml
i	Aqua dest.	(steril)	298 ml
insgesamt			1.000 ml

TABELLE 4: ZUSAMMENSETZUNG DER VERWENDETEN MEDIEN.

PBS (modifiziert nach WHITTINGHAM, 1971a)

KRBL (modifiziert nach WHITTINGHAM, 1968)

Dulbecco's phosphate-buffered salt solution (PBS)		Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung (KRBL)	
Komponente	Konzentr. (g/l)	Komponente	Konzentr. (g/l)
A			
1. CaCl_2 (wasserfrei)	0,1	1. CaCl_2	0,189
2. NaCl	8,0	2. NaCl	4,0
3. KCl	0,2	3. KCl	0,356
4. $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,1	4. $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,143
B			
5. KH_2PO_4	0,2	5. NaHCO_3	2,106
6. Na_2HPO_4	1,0	6. KH_2PO_4	0,161
7. NaH_2PO_4	0,15	7. Na-Laktat	2,801
8. Na-Pyruvat	0,036	8. Na-Pyruvat	0,055
9. D(+)Glukose(Monohydrat)	1,0	9. D(+)Glukose(Monohydrat)	1,001
10. BSA (lyophil) *1	3,0	10. BSA (lyophil) *1	4,0
11. Penicillin G- Kalium-Natrium	100.000 I.E./l	11. Streptomycinsulfat	0,05
		12. Penicillin G- *2	100.000 I.E./l
		Kalium-Natrium	

*1 Bovine Serum Albumin

*2 10^7 I.E. Penicillin G - K - Na setzen sich zusammen aus:

377 000 I.E. (K) und 9 623 000 I.E. (Na)

Die Sterilisierung der anorganischen Lösungen (a, b, 6 · e) und des Wassers (i) erfolgte im Autoklaven 50 Minuten bei + 120° C. Erst nach dem Erkalten wurden die 6 · 100 ml (e) in der in Tabelle 4 angegebenen Reihenfolge zu dem Wasser (i) geschüttet, da diese Art der Zugabe die Ausfällung unlöslicher Niederschläge verhindert. Die Lösungen der Komponenten A und B blieben vorerst unvermischt.

Die organischen Lösungen (c, f) wurden mit einer Atmosphäre Überdruck durch keimfreie Zellulosenitratfilter (Sartorius) gepreßt und in autoklavierten Flaschen aufzufangen. Als Treibgas diente Stickstoff. Die jetzt vorhandenen sterilen Stammlösungen (I bis V) waren erst nach gleichmäßiger Verteilung der Antibiotika gebrauchsfertig:

P B S

I	449 ml	Lösung a	+ 1 ml Pen.-Lsg.
II	449 ml	Lösung b	+ 1 ml Pen.- "
III	99 ml	Lösung c	+ 1 ml Pen.- "

K R B L

IV	898 ml	Lösung e und g	+ 1 ml Pen.-Lsg. + 1 ml Strept.-Lsg.
V	98 ml	Lösung f	+ 1 ml Pen.-Lsg. + 1 ml Strept.-Lsg.

Unmittelbar nach Ihrer Vervollständigung wurden alle fünf in Durchstechflaschen befindlichen Stammlösungen im Kühlschrank gelagert und jeweils nach einem Monat durch neue ersetzt. Einen Tag vor ihrer Verwendung erfolgte die Endzusammensetzung der Medien in einer Menge von jeweils 50 ml (PBS: 22,5 ml I + 22,5 ml II + 5 ml III; KRBL: 45 ml IV + 5 ml V).

Die Filtrierung bzw. Vermischung der gelösten Medienbestandteile geschah in keimarmer Umgebung (UV-bestrahlter Raum) unter ständiger Abflammung der Geräteteile, die mit

den sterilen Flüssigkeiten in Kontakt kamen.

Der Einstellung der pH-Werte auf 6,95 (PBS) und 7,1 (KRBL) mit 5 n Salzsäure, – die entsprechenden Werte der unbehandelten Medien lagen bei etwa 7,2 bzw. 8,4, – folgte die der Osmolarität. Hierbei fanden entionisiertes, steriles H₂O zur Herabsetzung und sterile physiologische Kochsalzlösung zur Erhöhung der osmotisch wirksamen Konzentration Verwendung. Die ursprünglichen Osmolaritäten von PBS und KRBL von ca. 0,286 und 0,240 osm wurden auf 0,276 und 0,249 osm eingestellt.

Der Grund für die Wahl solcher Werte lag nach den Ergebnissen von Vorversuchen in dem hohen Weiterentwicklungsprozentsatz der in-vitro kultivierten 2- und 8-Zell-Stadien (im Mittel > 80 %) bei Verwendung der Medien mit diesen Osmolaritäten und den genannten pH-Werten. Die Kontrolle der Eizellen dieser Vorversuche erfolgte nach 24-stündigem Brutschrankaufenthalt.

3.1.2. Superovulation und Eigewinnung

3.1.2.1. Versuchstiere und deren Vorbereitung

Zur Durchführung der Versuche fanden befruchtete Eizellen der Paarungen Ha/ICR Swiss x Ha/ICR Swiss (random bred) und NMRI (random bred) ♀ x C 57 B1 ♂ (Inzuchtstamm) Verwendung. Dazu wurden jeweils fünf Spendertiere hormonal vorbereitet. Der Zeitraum zwischen den Injektionen (i.p.) der Hormone Equoman^R (PMS) und Chorioman^R (HCG) betrug 48 Stunden, und die Dosis pro Tier lag für beide Hormone bei ca. 7,5 I.E. (5 bis 10 I.E.), gelöst in je 0,25 ml Solvens. Der Zeitpunkt der Verabreichung war auf 14.30 Uhr festgelegt. Unmittelbar nach der HCG-Injektion wurden die 7 bis 11 Wochen alten weiblichen Tiere mit Böcken im Alter von 10 Wochen bis 6 Monaten einzeln gepaart. Der am nächsten Morgen in der Scheide liegende Ejakulationspfropf galt als Zeichen erfolgter Kopulation. Die so gekennzeichneten Tiere wurden bis zu ihrer Verwendung zusammen in einen Käfig gesetzt.

^R eingetragenes Warenzeichen der Firma Cela

Für die planmäßige Durchführung von wöchentlich zwei Versuchen mußte ein Schema erstellt werden, das die Gewinnung der gewünschten Zellstadien ermöglichte.

Die 2-Zeller wurden 46 bis 48 Stunden, die 8-Zell- und Blastozystenstadien 66 bis 68 bzw. 87 bis 89 Stunden nach der HCG-Injektion aus dem Eileiter bzw. Uterus (Blastozysten) entnommen.

3.1.2.2. Methoden zur Eigewinnung

Die Tötung der Tiere erfolgte nacheinander im Abstand von ca. 30 Minuten. Dieser Zeitraum reichte aus, alle folgenden Arbeiten einschließlich der Sammlung der gefundenen Eizellen auszuführen.

Hierbei wurden Ovar, Eileiter und Uterushorn jeweils einer Seite zusammenhängend entfernt und in eine Plastikpetrischale (Abb. 1.1) mit 2,5 ml zimmerwarmem PBS-Medium verbracht. Anschließend mußten die die Eizellen enthaltenden Teile isoliert und wegen der Blutverunreinigung des Mediums in weitere 2,5 ml PBS umgesetzt werden. Während die jungen Blastozysten ohne mikroskopische Kontrolle mit 1 ml Flüssigkeit und einer dünnen Injektionskanüle (Nr. 18) aus dem Uterushorn gespült werden konnten, war die Gewinnung der 2- und 8-Zeller aus dem Eileiter nur bei 32-facher Vergrößerung unter dem Stereomikroskop (Leitz) möglich. Die Spülung des Uterus erfolgte in Richtung auf die Hornspitze. Die portionsweise Ausstreifung des gesamten Eileiters, beginnend an der utero-tubalen Verbindung, geschah mit Hilfe eigens dazu angefertigter, spitz ausgezogener steriler Glasstäbe (Abb. 1.3). Die jeweils entleerten Teile wurden abgesetzt.

Nach Beendigung dieser Arbeiten wurden die Eizellen bei 60-facher Vergrößerung unter einem Umkehrmikroskop (Wild, M 40) mit Kreutztisch (Abb. 2.U) in eine feine, silikonisierte Glaspipette (Abb. 1.6) gesaugt. Durch die Verwendung eines Mikromanipulators (Leitz; Abb. 2.M) konnte dieser Vorgang beschleunigt werden. Da das Gesichtsfeld nicht die gesamte Petrischale erfaßte, mußte die Suche

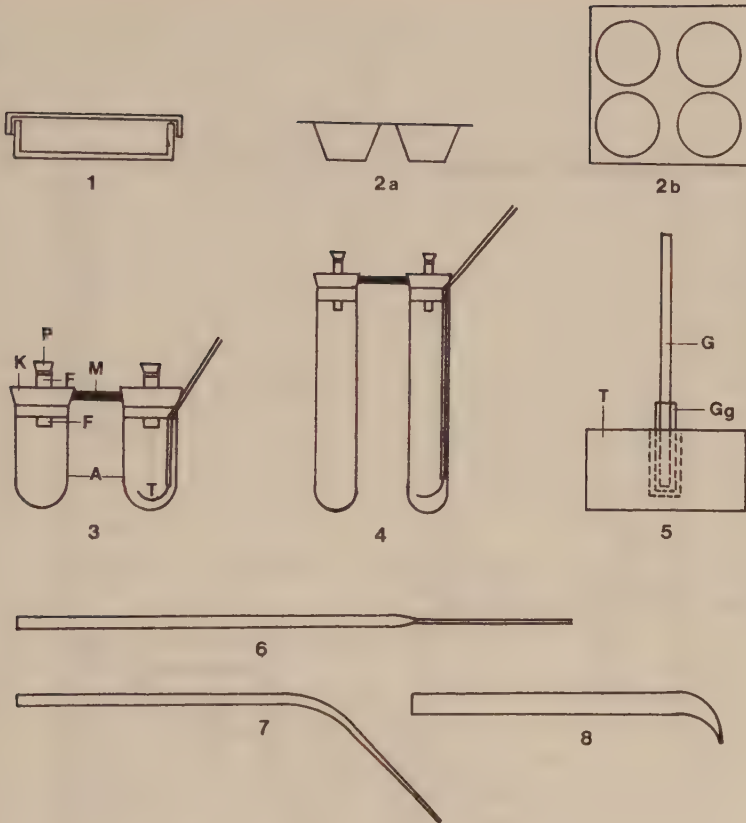


Abb. 1 MATERIAL UND GERÄT ZUR IN-VITRO-MANIPULATION VON EIZELLEN.
1: Plastikpetrischale (35x10 mm); 2: "Makroplatten" aus Kunststoff, a Seitenansicht, b Aufsicht; 3: Glasröhrchen zum Tiefgefrieren nach Methode I und II (16x40 mm; Fassungsvermögen je 5 ml; A Abstand 10 mm; F flexibles Plastikröhrchen; K Korkstopfen; M Metallsteg; P Plastikstopfen; T Temperaturfühler); 4: Glasröhrchen zum Tiefgefrieren nach Methode III (10x57 mm; Fassungsvermögen je 3,5 ml); 5: Glaspipette zur Eisinduzierung (G Pipette; Gg Glasgefäß; T Trockeneis); 6: Glaspipette zum Aufsaugen der Eizellen; 7: Transplantationspipette; 8: Glasstab zum Ausstreifen des Eileiters.

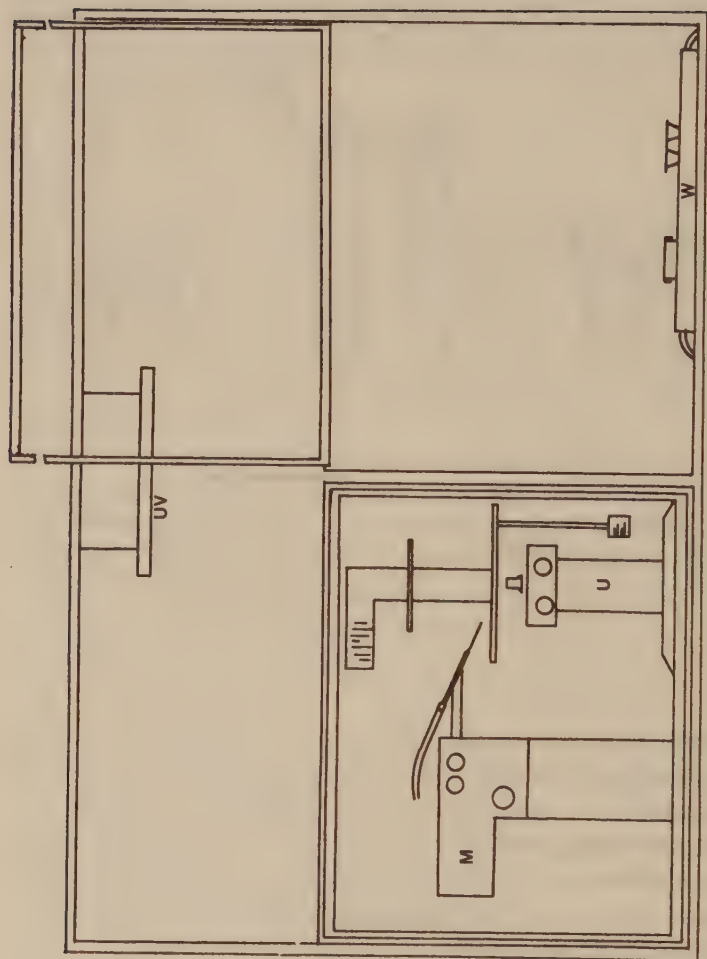


Abb. 2 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES "GLASKASTENS" MIT INSTRUMENTEN ZUM SUCHEN, SAMMELN UND ZUR WARMHALTUNG DER EIZELLEN. M: Mikromanipulator; U: Umkehrmikroskope; UV: UV-Lampe; W: Warmwasserbehälter aus Kupfer (ständig von 37° C warmem Wasser durchlaufen)

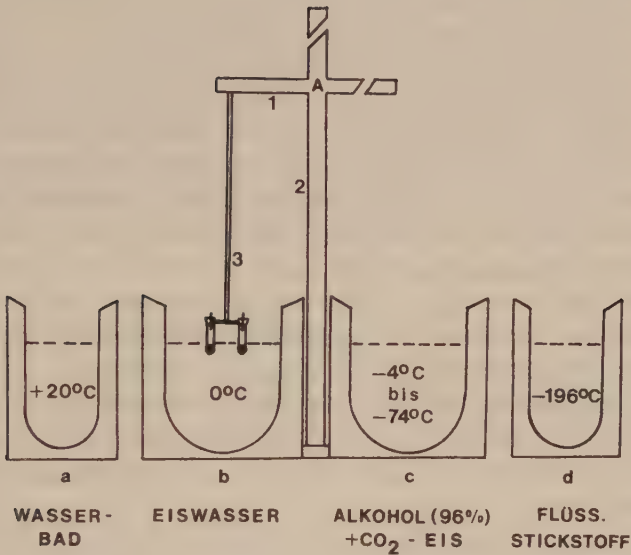


Abb. 3 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER "TIEFGEFRIEREINHEIT" FÜR VERSUCHE NACH METHODE III.

1 und 2: Starre Elemente (Stativ); Arm 1 ist horizontal und vertikal verschiebbar bzw. um Punkt A drehbar; 3: Flexibles Element; a und d: Thermosbehälter mit 1150 ml Fassungsvermögen; b und c: Thermosbehälter mit 2300 ml Fassungsvermögen. Im Behälter c wurde die Anfangstemperatur von - 4° C durch Zugabe von CO₂-Eis eingestellt und anschließend auf - 74° C in gewünschter Zeiteinheit abgekühlt.

der Eizellen mäanderartig erfolgen. Eine speziell entwickelte, von Hand bediente Ansaugvorrichtung verhinderte eine ruckartige Bewegung der Flüssigkeiten bei Füllung und Entleerung der Pipette und erlaubte das Einsaugen geringster Mengen des Mediums ($< 0,001$ ml). Der am Ende der Pipette angeschlossene, mit Öl gefüllte Plastikschlauch führte zum Konus einer Spritze, die ebenfalls Paraffin enthielt. Durch Drehung eines kleinen Rädchens konnten der Kolben und damit der Inhalt der Spritze in beide Richtungen bewegt werden.

Waren alle Eizellen aus dem Medium entfernt, folgte die Umsetzung in auf $+37^{\circ}\text{C}$ vorgewärmte PBS gleicher Menge. Zur Aufrechterhaltung dieser Temperatur diente ein ständig von gleichmäßig warmem Wasser durchflossener Kupferbehälter (Abb. 2.W), auf dem die Petrischalen mit den darin enthaltenen Zellen bis zu deren Weiterverwendung verblieben.

Nach Gewinnung aller Eizellen wurden sie erneut in 2,5 ml PBS gewaschen, um eine Verunreinigung durch Fremdzellen möglichst gering zu halten.

3.1.3. In-vitro-Kultivierung

Etwa 25 % dieser Eizellen wurden gleich darauf als Kontrolle in KRBL (2,5 ml; $+37^{\circ}\text{C}$), die generell für die Brutschrankkultivierung diente, gespült und in "Makroplatten" (Abb.1; 2.a und 2.b) verbracht. In jeweils einer der vier Vertiefungen befanden sich in 0,5 ml Medium der besseren Übersicht wegen nur etwa 20 Eier. Durch die anschließende Übersichtung mit 1 ml Paraffinum liquidum (nicht vorbehandelt!) war das die Zellen enthaltende Medium von dem Milieu seiner Umgebung getrennt.

Um die nun so im Brutschrank aufbewahrten Eizellen auch bei wiederholtem Öffnen und Schließen der Schranktüre vor Temperaturschwankungen bewahren zu können, wurden die Makroplatten zusätzlich in einen Exsiccator gestellt.

Die Keimkontamination des Arbeitsraumes verminderten drei UV-Lampen, die zwölf Stunden lang bis zum Arbeitsbeginn brannten. Die innen über der Eingangstüre befindliche Lampe blieb auch während der Versuche eingeschaltet. Mikromanipulator, Umkehrmikroskop und Warmwasserbehälter waren zusammen in einem verschließbaren Glaskasten, der eine der UV-Lampen enthielt, untergebracht. Die verwendeten Plastik- und Metallgeräte waren entweder keimfrei oder wurden vor Gebrauch sterilisiert.

3.1.4. Tiefgefrierkonservierung

In allen Versuchen ist PBS als Gefriermedium eingesetzt worden. Die Kühl- und Auftauraten sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

TABELLE 5: KÜHL- UND AUFTAURATEN BEI VERSUCHEN NACH
METHODEN I UND II

Methode	Kühlrate (°C/min)	Temperatur- bereich (°C)		Auftaurate (°C/min)	Temperatur- bereich (°C)	
		von	bis		von	bis
I	ca. 14	+31	0	90	-79	0
	ca. 86	0	-79	29	0	+20
II	ca. 14	+31	0	ca. 1	-79	0
	ca. 1	0	-70	ca. 30	0	-20

3.1.4.1. Methode I (modifiziert nach WHITTINGHAM, 1971a)

Bevor die von der Kontrolle getrennten Eizellen (Ha/ICR x Ha/ICR) eingefroren werden konnten, mußten einige Voraussetzungen technischer Art geschaffen und Vorbereitungen zur reibungslosen Durchführung der Konservierung getroffen werden.

3.1.4.1.1. Material und Geräte

Als Gefrierschutzsubstanz fand PVP (Roth) mit dem Molekulargewicht 40.000 Verwendung. 0,5 ml einer 15 %igen Lösung von PVP in PBS (7,5 g ad 50 ml) wurden in einer 1 ml fassenden Einmalspritze mit zerkleinertem Eis vorgekühlt und bis zu ihrer Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

Zwei Thermosbehälter mit je 2300 ml Fassungsvermögen (Abb. 3.b oder 3.c) enthielten als Kühlflüssigkeit einmal ca. 500 ml Eiswasser von 0°C , zum anderen etwa 2150 ml 96 %igen Äthylalkohol, dessen Temperatur durch Zugabe von zerkleinertem Trockeneis auf -79°C herabgesetzt worden war. Zwischen diesen beiden Gefäßen befand sich ein Stativ, dessen horizontaler Arm über ein flexibles Aufhängeelement mit zwei Röhrchen in Verbindung stand. Eines der Röhrchen diente der Aufnahme von Eizellen, das andere der Messung von Kühl- und Auftaugeschwindigkeit, die von einem Thermographen (Varian) festgehalten wurden. Ein Kupfer-Konstantan-Element verband das Kontrollröhrchen mit diesem Temperaturschreiber, dessen Meßbereich sich von $+50^{\circ}\text{C}$ bis -200°C erstreckte.

Form, Abmessung und technische Einzelheiten sind aus den Abbildungen 1 und 3 bzw. deren Legenden zu ersehen.

3.1.4.1.2. Versuchsablauf

Alle auf dem Warmwasserbehälter bei $+37^{\circ}\text{C}$ in Petrischälchen lagernden Eizellen (bis 75 Stück) wurden mit möglichst wenig Flüssigkeit ($< 0,001\text{ ml}$) in ein Röhrchen mit 0,25 ml PBS pipettiert. Die gleiche Menge Medium befand sich in dem zweiten Gefäß, das der Temperaturkontrolle diente. Nach dem Verschluß beider Glasbehälter mit den dafür vorgesehenen Kork- und Plastikstopfen hingen sie nunmehr starr miteinander verbunden am horizontalen Arm des Stativs. Sobald die Temperatur von $+31^{\circ}\text{C}$ erreicht war, wurden beide Röhrchen bis über die Hälfte in das Eiswasser getaucht. War das Medium auf 0°C gekühlt, erfolgte die Zugabe von je 0,25 ml der vorgekühlten PVP-

Lösung in beide Gefäße. Die Endkonzentration von PVP betrug damit 7,5 %. Zur Einfüllung durch die flexiblen Plastikröhrchen F sind die Stopfen P kurz entfernt und wieder aufgesetzt worden (Abb. 1.3.F und 1.3.P). Nach einer Wartedauer von 15 Minuten - während dieser Zeit konnten sich die Flüssigkeiten vermischen - erfolgte die Umsetzung der Glasröhrchen in das Alkoholbad und verblieben dort nach Sturzkühlung auf -79°C eine halbe Stunde bis zu Beginn des Wiederauftauvorgangs.

Während der raschen Erwärmung bis auf $+20^{\circ}\text{C}$ in einem mit $+37^{\circ}\text{C}$ warmem Wasser gefüllten dritten Thermosbehälter wurde bei beginnender Verflüssigung des Mediums 1 ml PBS ($+37^{\circ}\text{C}$) zur Verringerung der PVP-Konzentration zuge-setzt.

Die Eizellen wurden aus dem Medium in der Plastikscha-le entnommen, dann ihre morphologische Beschaffenheit über-prüft und anschließend zweimal in je 2,5 ml PBS gewa-schen. Die schon oben beschriebene Form der Kultivierung aller wiedergefundenen Zellen im Brutschrank und die Überprüfung der Weiterentwicklung von Kontrolle und Ver-suchsobjekten nach 24 Stunden Bebrütung schlossen den Versuch ab.

3.1.4.2. Methode II

Bei dieser Art der Gefrierkonservierung fanden Eizellen gleicher Herkunft, gleiche Materialien und Geräte Verwen-dung. Änderungen stellten nur die wesentlich verlangsamt-ten Kühl- und Auftaugeschwindigkeiten dar (Tabelle 5), die durch eine Modifizierung erreicht wurden.

Nach 15 Minuten dauernder Equilibrierung im Eiswasser ka-men die Versuchsröhrchen so lange nicht mit dem vorgekühl-ten Alkohol in Berührung, bis ihr Inhalt eine Temperatur von -70°C erreicht hatte. Ein gleichmäßig langsamer Wärmeverlust konnte durch schrittweise Verringerung des Abstandes der Gefäße von der Alkoholoberfläche erreicht werden.

Die Eisbildung trat spontan bei ca. -10°C ein. Durch die freiwerdende Kristallisationswärme stieg die Temperatur der erstarrten Medien plötzlich bis nahe 0°C und glich sich erst nach etwa fünf Minuten wieder der Umgebungstemperatur an. Die bei dieser Anpassungsphase beobachtete Abkühlgeschwindigkeit war wesentlich größer als 1°C/min .

Der Auftauvorgang lief durch Vergrößerung des Abstandes zwischen Bad und Röhrchen entsprechend ab. Wenn die Innentemperatur der Röhrchen 0°C erreicht hatte, wurden sie in ein Wasserbad von $+37^{\circ}\text{C}$ verbracht, bis die Innentemperatur $+20^{\circ}\text{C}$ betrug.

3.1.4.3. Methode III (modifiziert nach WHITTINGHAM und Mitarbeiter, 1972)

3.1.4.3.1. Material und Geräte

Als Gefrierschutzsubstanz fand dieses Mal DMSO (Roth) Verwendung. 0,2 ml einer 2 molaren Lösung (156,26 g DMSO + steriles H_2O ad 1000 ml), zweimal 0,8 ml und 1 ml PBS sind in vier Einmalspritzen (1 ml) aufgezogen, in zerkleinertem Eis vorgekühlt und bis zu ihrer Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt worden. Eine fein ausgezogene, ca. 10 cm lange Kapillare mit 1 mm Innendurchmesser wurde mit entionisiertem, sterilem Wasser etwa zu einem Drittel gefüllt und, geschützt durch ein kleines Glasgefäß, in einen Trockeneisquader gestellt (Abb. 1.5). Dieses gefrorene Wasser diente zur späteren Induzierung der Eiskristallbildung.

Unmittelbar links und rechts neben dem Stativ befanden sich zwei Thermosbehälter mit Kühlflüssigkeiten. Der eine enthielt ca. 500 ml Eiswasser, der andere etwa 1250 ml Äthylalkohol, der durch Zugabe von Trockeneis eine Temperatur von -4°C erreicht hatte (die schematische Darstellung der "Tiefgefriereinheit" geht aus Abbildung 3 hervor). Die nach dem gleichen Prinzip wie bei Methode I miteinander verbundenen, verschlossenen und aufgehängten

TABELLE 6: KÜHL- UND AUFTAU-RATEN BEI VERSUCHEN NACH
METHODE III

Konservierungsphase	Temperaturbereich von bis		Kühlrate
1. im Eiswasserbad	21° C	0° C	in ca. 2 Min.
2. Zugabe von DMSO		bei 0° C	
3. im Alkoholbad	0° C	-4° C	in ca. 2 Min.
4. Induktion der Eis- bildung		bei -4° C	
5. im Alkoholbad	-4° C	-74° C	ca. 0,7° C/min*
6. im Stickstoffdampf	-74° C	-110° C	ca. 15° C/min
7. in flüssigem Stickstoff	-110° C	-196° C	
8. Lagerung		bei -196° C	

Auftauphase	Temperaturbereich von bis		Kühlrate
1. im Stickstoffdampf	-196° C	-110° C	in ca. 5 Min.
2. im Stickstoffdampf	-110° C	-80° C	ca. 14° C/min
3. im Stickstoffdampf	-80° C	-5° C	ca. 7° C/min
4. im Wasserbad von + 20° C	-5° C	0° C	ca. 5 Sek.
5. im Eiswasserbad		bei 0° C	ca. 2 Min., da- bei stufenweise Verringerung der DMSO-Kon- zentration

* 3,8° C/min (nur im abschließenden Versuch)

Gefriergefäße hatten die Maße 10 x 57 mm (Abb. 1.4).

3.1.4.3.2. Versuchsablauf

Die auf dem Wärmebehälter befindlichen Eizellen (NMRI x C57 Bl) wurden zusammen (bis zu 70) mit möglichst wenig Flüssigkeit in ein 0,1 ml PBS enthaltendes Gefäß übertragen. Das Glasröhrchen für die Temperaturkontrolle enthielt die gleiche Menge Medium. Beide wurden darauf durch Kork- und Plastikverschluß starr miteinander über dem Eiswasserbad verbunden (die Kühl- und Auftauraten sind aus der Tabelle 6 zu ersehen). Hatten die einzufrierenden Medien Zimmertemperatur ($+ 21^{\circ}\text{C}$) erreicht, erfolgte ihre Abkühlung durch Eintauchen der Röhrchen in das Eiswasser. Bei 0°C wurden jeweils 0,1 ml vorgekühlte DMSO-Lösung zugesetzt, so daß die Gefrierschutzsubstanz nunmehr auf eine 1 molare Endkonzentration verdünnt war.

Der Equilibrierung, die durch wiederholtes Schütteln von Hand beschleunigt worden war, schloß sich fünf Minuten später die Umsetzung der Glasgefäße in das Alkoholbad an. Hatte die Temperatur des Gefriermediums sich der des Bades angeglichen, wurde die Eisbildung mit dem in der Glaskapillare gefrorenen Wasser induziert. Hierzu waren der Stopfen P zu entfernen und das Eis der Kapillare kurz mit der Oberfläche des unterkühlten PBS in Berührung zu bringen. Ohne weitere Abkühlung innerhalb der nächsten fünf Minuten konnte der Vorgang des Eiswachstums ungestört ablaufen. Die anschließende portionsweise Zugabe von zerkleinertem Trockeneis in das Alkoholbad erniedrigte die Temperatur gleichmäßig langsam bis $- 74^{\circ}\text{C}$. Das während dieser Zeit bereitgestellte, etwa zu einem Drittel mit flüssigem Stickstoff gefüllte Thermosgefäß diente der weiteren Abkühlung der Medien bis $- 110^{\circ}\text{C}$ bzw. $- 196^{\circ}\text{C}$. Dazu wurden die Glasröhrchen zunächst in den Stickstoffdampf gehängt und ihr Abstand zur Flüssigkeitsoberfläche langsam verringert. Die dann folgende rasche Abkühlung von $- 110^{\circ}\text{C}$ bis $- 196^{\circ}\text{C}$ geschah im flüssigen Stickstoff selbst. Die Lagerungszeit bei dieser Endtempe-

ratur betrug zwei Stunden.

Der Auftauvorgang begann mit der schnellen, unkontrollierten Erwärmung bis -110°C und wurde unter Kontrolle des Thermoschreibers etwas verlangsamt bis -80°C fortgeführt. Die geringste Temperaturerhöhung pro Zeiteinheit fand zwischen -80°C und -5°C statt, wobei wiederum ihre Gleichmäßigkeit berücksichtigt wurde. Bis zu diesem Zeitpunkt befanden sich die erstarrten Medien im Stickstoffdampf. Die Wärmezufuhr konnte durch den kontinuierlich vergrößerten Abstand der Versuchsgefäße zur Flüssigkeitsoberfläche geregelt werden. War die Temperatur von -5°C erreicht, wurden die Glasröhrchen (etwa fünf Sekunden lang) in zwischenzeitlich bereitgestelltem Wasser von $+20^{\circ}\text{C}$ geschwenkt, bis der Inhalt eine Temperatur von ca. 0°C erreicht hatte. Anschließend wurden sie ins Eiswasser verbracht. Etwa 30 Sekunden später begann die schrittweise Verdünnung des DMSO im Abstand von jeweils einer halben Minute mit dem seit Versuchsbeginn vorgekühlten PBS (0,2 ml - 0,2 ml - 0,4 ml). In einem abschließenden Versuch ist die Kühlrate zwischen -4°C und -74°C erhöht worden. Dies geschah, um die Frage zu klären, ob eine Beschleunigung des Einfriervorgangs möglich sei.

Nach Entleerung des die Eizellen enthaltenden Gefäßes wurde es mit weiteren 1 ml vorgekühltem Medium gespült und die Flüssigkeit der schon in einer Petrischale befindlichen zugegeben. Die Rückgewinnung der Eizellen begann erst nach etwa 15 Minuten, da vorher deren Auffinden durch das an der Petrischale gebildete Kondenswasser erheblich erschwert war.

Alle nach wiederholtem Suchen gefundenen Eizellen (hierzu gehörten auch solche ohne Blastomeren) wurden gezählt, zweimal in je 2,5 ml Krebs-Ringer-Medium gespült und beurteilt. Dabei konnte man zwei Erscheinungsformen unterscheiden, einmal die augenscheinlich unversehrten, zum anderen die degenerierten Eizellen. Zu der letzten Gruppe

gehörten Eizellen, die

- a durch Zerstörung der Zona pellucida alle oder den größten Teil ihrer Blastomeren verloren hatten (Erscheinungsform: leere Hüllen oder fast leere Hüllen);
- b bei offensichtlich unzerstörter oder nur teilbeschädigter Zona pellucida (Risse, herausgelöste Teile der Hülle) Veränderungen an Gestalt und Struktur der Blastomeren erkennen ließen (Vermischung des Blastomereninhalts mit dem anderer und/oder grobkörnige Degeneration der Blastomerenbestandteile).

Mit Ausnahme der leeren Hüllen sind die degenerierten Zellen in gleicher Weise wie die unveränderten im Brutschrank kultiviert worden. Die morphologisch stark veränderten Eizellen wurden stets gesondert kultiviert. Der zahlenmäßige Anteil der das Stadium der Blastozyste erreichenden Eizellen wurde als Prozentsatz aller nach dem Auftauen zurückgewonnenen Stadien angegeben.

3.1.5. Rücktransplantation (modifiziert nach MCLAREN und MICHIE, 1956)

3.1.5.1. Vasektomie der Böcke

Die zur Induzierung der Scheinträchtigkeit von Ammentieren eingesetzten Böcke (NMRI) hatten vor ihrer Sterilisation jeweils zwei Würfe gezeugt.

Vor Eröffnung der Bauchhöhle in der Medianlinie wurden die 10 bis 15 Wochen alten Tiere mit einer 2 %igen Pentobarbital-Na-Lösung (Narcoren; Rentschler) anaesthetisiert und in Rückenlage fixiert. Die Dosis des Barbiturates betrug 75 mg/kg Körpergewicht, die Applikation erfolgte intraperitoneal.

Etwa drei Minuten nach Verabreichung setzte die Wirkung des Narkosemittels ein. Das reaktionslose Toleranzstadium, dem ein oft über mehrere Stunden dauernder Nach-

schlaf folgte, endete ca. 40 Minuten später.

Mit mehreren Scherenschlägen wurden die Fellhaare der Bauchdecke kranial des Praeputiums bis zum Nabel zweifingerg breit entfernt. Das Operationsfeld wurde desinfiziert und ein 1 cm langer Schnitt, der unmittelbar kranial des Praeputiums begann, eröffnete die Bauchhöhle. Ein in kaudaler Richtung eingeführter stumpfer Wundhaken verlagerte Hoden und Samenstrang einer Seite extraperitoneal. Der Samenstrang wurde isoliert und zwischen zwei zuvor angebrachten Catgutligaturen durchtrennt. Nachdem die außen auf der Wunde liegenden Teile wieder in die Bauchhöhle versenkt waren, wiederholte sich der gleiche Vorgang auf der anderen Seite. Zwei alle Schichten erfassende Catgutachternähte verschlossen die Wunde, die vier bis fünf Tage später völlig ausgeheilt war. Vor ihrem Einsatz wurde die Sterilität dieser Tiere durch Paarung mit je zwei Weibchen überprüft. Alle Eingriffe zeigten den erwarteten Erfolg.

3.1.5.2. Spendereizelle und Empfängertiere

Die transplantierten Eizellen entstammten den zweimal wöchentlich nach Methode III durchgeführten Tiefgefrierversuchen mit 8-Zell-Stadien aus den Paarungen NMRI ♀ x C57 Bl ♂. Die einen Tag später daraus entstandenen jungen Blastozysten wurden übertragen.

Um die 13 bis 16 Wochen alten juvenilen Empfängertiere (NMRI) in eine bezüglich des Spendereialters (S) asynchrone Phase zu bringen, wurde ihr Östrus 24 Stunden nach dem der Spender induziert. Die daraus resultierende Phasenverschiebung von 24 Stunden ist unter Berücksichtigung der während des Konservierungsprozesses für ca. 4,5 Stunden unterbrochenen Weiterentwicklung der 8-Zeller noch verändert, d. h. um 4,5 Stunden verringert worden. Die zeitliche Differenz der Phasen war also 19,5 Stunden (24 Stunden - 4,5 Stunden = 19,5 Stunden).

In Anlehnung an die neuere Literatur entspricht das der

Ausdrucksform: S Tag 4 / E Tag 3 (Erklärung siehe 2.4.2.2.). Der erwähnte Zeitverlust (4,5 Stunden) gibt die Anzahl der Stunden wieder, die vom Eintauchen in das Eiswasserbad zu Beginn des Gefriervorgangs bis zur Wiedererwärmung der Eizellen auf -5°C vergangen sind.

3.1.5.3. Eizellübertragung und Graviditätskontrolle

Jeweils zehn junge Blastozysten wurden aus dem paraffinüberschichteten Kulturmedium gesaugt und zweimal in erwärmter ($+37^{\circ}\text{C}$) KRBL gewaschen, um die Übertragung von Ölresten oder inzwischen gewachsenen Keimen zu verhindern. Bis zum eigentlichen Transfer verblieben die Zellen in einer Petrischale auf dem Warmwasserbehälter. Die als Amme vorgesehene, scheinträchtige Maus wurde unter Narkose in Seitenlage fixiert. Nach Entfernung der Fellhaare im Bereich der rechten Flanke und Desinfektion des so vorbereiteten Operationsfeldes erfolgte die schrittweise Eröffnung der Bauchhöhle, beginnend mit einem dorsolateralen, 1 cm langen Hautschnitt. Die Lage des jetzt schon durch die dünne Muskelschicht erkennbaren Ovars mit seinem Fettkörper erleichterte die weitere Orientierung des Operateurs. 1 cm kaudal dieser Stelle wurde zuerst die Muskulatur durchstoßen, dann die Wunde mit einer Schere in horizontaler Richtung beidseitig um etwa 0,5 cm verlängert. Ovar und Uterushorn wurden anschließend extraperitoneal verlagert (stumpfer Wundhaken) und durch einen quer zum Wundverlauf untergeschobenen, kurzen Glasstab (Durchmesser 2 mm) in dieser Lage gehalten. Die damit erzeugte Spannung blieb so gering, daß ein Zerreißen der Bänder und Versorgungsgefäße nicht zu erwarten war.

Die vorbereiteten Eizellen (10) wurden nun mit weniger als 0,001 ml Medium in die an ihrem dünnen Ende abgestumpfte Transplantationspipette (Abb. 1.7) gesaugt. Die Flüssigkeitssäule ist anschließend durch Ansaugen von Luft bis etwa in die Mitte der Kapillarverdünnung gezogen worden. Das vorbereitete Empfängertier lag jetzt auf dem in alle Richtungen schwenkbaren Tisch des Umkehrmikro-

skops. Der unter dem Uterushorn fixierte Glasstab mußte weiter nach kaudal verschoben werden, um den Uterus im Bereich der gedachten Punktionsstelle (Hornmitte) vorsichtig zu dehnen. Pipette und Punktionsstelle wurden einander so genähert, daß die Glasspitze im stumpfen Winkel in Richtung auf die Hornspitze in das Organlumen eindringen konnte. Die Pipette wurde ca. 1 cm weit eingeführt und ihre Spitze unter langsamem Austreiben der Flüssigkeit zur Perforationsstelle zurückbewegt. Um zu verhindern, daß die injizierten Eizellen mit dem Medium wieder austraten, wurde der zur Dehnung benutzte Glasstab gleichzeitig entfernt.

Der Wundverschluß in Form zweier Catgutachternähte verband alle getrennten Gewebeteile miteinander. Das operierte Tier wurde zum Schutz gegen größere Unterkühlung bis zur Beendigung des Nachschlafs wärmebestrahlt.

Zur Graviditätskontrolle sind die Tiere in unregelmäßigen Abständen bis zur Autopsie am Tag 18 oder bis zur Geburt gewogen worden. Gleichzeitig diente das Wachsen der Zitzen als Zeichen der Trächtigkeit.

Die Entwicklung dieser Übertragungstechnik war notwendig, weil erste Transplantationsversuche scheiterten. Die Mißerfolge ließen sich auf mehrere Fehler zurückführen. Einmal endete die aufgezoogene Flüssigkeitssäule an der dünnen Öffnung der Pipette, die sich bei Berührung mit dem Uterushorn spontan durch die Wirkung der Kapillarkraft entleerte. Weiterhin war das Horn so stark von einem untergeschobenen Glasstab (Durchmesser 5 mm) gespannt, daß das injizierte Medium nach dem Herausziehen der Pipette aus dem Organlumen durch die Perforationsstelle nach außen gepreßt wurde. Häufig rissen infolge kräftigen Zuges an den Bändern Versorgungsgefäße, und das ausströmende Blut machte die notwendige Übersicht über das Operationsfeld unmöglich. Hinzu kam die wiederholte Verwendung von Pipetten, deren feine Spitzen nicht abgeflammt, scharfe Ränder besaßen. Die Folgen waren Endometriumlaesionen mit Blutungen aus den Perforationsstellen.

3.1.6. Chromosomanalyse an Mäuseblastozysten (modifiziert nach TARKOWSKI, 1966 und MCFEELY, 1966)

3.1.6.1. Anfertigung der Präparate

Die zur Darstellung ihrer Chromosomen verwendeten jungen Blastozysten waren gleichen Ursprungs und Alters wie die zur Transplantation verwendeten Eizellen. Hinzu kamen noch gleichaltrige Zellen der unbehandelten Brutschrankkontrollen, deren Chromosomenmorphologie als Beurteilungsgrundlage diente. Zweimal wöchentlich (Mittwoch und Freitag) wurden Präparate angefertigt, am Vormittag die der Kontrollen, am Nachmittag die der kältevorbehandelten Eizellen, da diese erst dann den entsprechenden Entwicklungsstand erreicht hatten. Nach ihrer Entfernung aus den Makroplatten wurden die Blastozysten zweimal in je 2,5 ml KRBL (+ 37° C) gewaschen und in ein Mikroskopierschälchen mit etwa 2 ml kolchizinhaltigem Medium verbracht. Der flüssige Mitosestopper Colcemid (Gibco) war in einer Menge von 0,125 ml (1,25 µg) kurz vorher mit 5 ml KRBL vermischt (0,125 ml + 5 ml) und auf + 37° C vorgewärmt worden. Das Schälchen mußte zur Verhinderung der Austrocknung mit Aluminiumfolie abgedeckt werden, bevor es 1 1/4 Stunden im Brutschrank aufbewahrt wurde. Während dieser Zeit konnten die in einer Mischung gleicher Anteile Äther und 95 %igem Alkohol entfetteten Objektträger beschriftet werden. Anschließend erfolgte die Zusammensetzung des Fixativs aus Eisessig und Methanol im Verhältnis 1 : 3. Als Tropfpipette diente eine in der Mitte ihrer dünnen Spitze abgebrochene Eizellenpipette mit aufgesetztem Gummiballon.

Etwa 2 ml der zur hypotonischen Behandlung hergestellten 1 %igen Na-Zitratlösung wurden in einem zweiten Mikroskopierschälchen auf + 37° C erwärmt und abgedeckt auf dem Warmwasserbehälter bereitgestellt. Nach Ablauf der zuvor erwähnten Zeit wurden nacheinander jeweils 3 Blastozysten in die Na-Zitrat-Lösung umgesetzt und 10 bis 13 Minuten lang der Quellung überlassen. Anschließend kam jede ein-

zelne Eizelle mit möglichst wenig Lösung ($< 0,001$ ml) auf einen Objektträger. Unmittelbar danach wurde ein Tropfen Fixativ auf die Zelle geträufelt. Die gleichmäßige Vermischung der beiden Flüssigkeiten geschah durch rollende Bewegung der Objektträger. Ein kleiner Ausschnitt der Glasoberfläche konnte so nahezu kreisrund und gleichmäßig benetzt werden. Die schnelle, mit der Erscheinung von Newton-Ringen verbundene Trocknung geschah durch ständiges Blasen. Dabei mußte der Objektträger wenigstens 15 cm vom Mund entfernt bleiben, um einen Niederschlag der Atemfeuchtigkeit zu verhindern. Waren die gequollenen Eizellen aufgearbeitet, konnten die verbleibenden, wiederum zu dritt, hypotonisch vorbereitet werden.

Bei ausreichender Übung im Umgang mit Gerät und Zellmaterial ist der Gesamtvorgang insofern abkürzbar, als man gleichzeitig bis zu 10 Eizellen zur Quellung bringt und etwa drei bis vier von ihnen auf einem Objektträger fixiert.

Die Färbung der Chromosomen geschah am folgenden Tag. Dazu wurde eine 2 %ige Orceinlösung in 50 %iger wässriger Essigsäure hergestellt. Zur besseren Lösung der Farbkristalle mußte die Mischung dreimal hintereinander aufgekocht werden. Im Abstand von drei Wochen wurden die Lösungen erneuert. Jeder 45 Minuten dauernden Färbung ging eine Filtrierung voraus.

Die Spülung und Entwässerung der Präparate geschah in folgender "Alkohol-Xylol-Reihe":

1. 50 %ige wässrige Essigsäure
2. Tertiärer Butylalkohol (TBA)
3. TBA : XYLOL (2 : 1)
4. TBA : XYLOL (1 : 1)
5. TBA : XYLOL (1 : 2)
- *6. TBA : XYLOL (1 : 2)
7. XYLOL
- *8. XYLOL

* Spülung jeweils ca. 3 Minuten (siehe Nr. 6 und 8)

Bis auf zwei Ausnahmen wurden die Objektträger in jedem Bad nur kurz gespült. Die Einbettung in Eukitt erfolgte nach Verdunstung des Xylols.

Die Blastozysten waren schon jetzt mit bloßem Auge als winzige, rotgefärbte Punkte zu erkennen. Dadurch war die Suche nach den Chromosomen unter dem Stereomikroskop bei 64-facher Vergrößerung sehr erleichtert. Präparate, bei denen Metaphasen oder Teile davon erkennbar waren, wurden gekennzeichnet, aussortiert und bis zum völligen Erstarren der Einbettungssubstanz (i. d. R. am nächsten Morgen) im Warmluftstrom über einem Heizungskörper aufbewahrt.

3.1.6.2. Auswertung der Mitosen

Zur photographischen Darstellung wurden nur vollständige Chromosomensätze verwendet. Lagen zwei oder mehrere Metaphasen dicht beieinander bzw. waren die Chromosomen einer Metaphase weit verstreut, wurden sie mangels eindeutiger Zuordnung nicht ausgewertet. Diese Verfahrensweise schloß jedoch sog. Anschlußaufnahmen nicht aus. Diese waren immer dann notwendig, wenn sich die abzubildenden Objekte an der Peripherie des Gesichtsfeldes unscharf abzeichneten oder verschiedentlich jenseits der photographisch erfaßbaren Grenzen befanden. Die Aufnahmen mit einem 100ter Objektiv (Ölimmersion) wurden von dem Photomikroskop II (Zeiss) automatisch belichtet und vom Negativfilm (Agfa Isopan IF, 17/10) auf Dokumentenpapier abgezogen. Die Chromosomen konnten jetzt ausgeschnitten, nach Ähnlichkeit paarweise und mit abnehmender Größe nacheinander aufgeklebt werden. Im Anschluß daran wurden diese Darstellungen mit dem Polaroidverfahren festgehalten.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Methode I

In drei Versuchen wurden insgesamt 160 Eizellen im 8-Zell-Stadium (Abb. 4.a und 4.b) eingefroren. Alle der 135

(84,4 %) nach dem Auftauen zurückgewonnenen Zellen waren augenscheinlich degeneriert. Dabei standen die grobkörnige Degeneration der Blastomeren (Abb. 4.c) bei gleichzeitigem Verlust ihrer Grenzstrukturen im Vordergrund. Die Zerstörung der Zona pellucida mit dem Verlust von Blastomeren trat nur in wenigen Fällen in Erscheinung. Nach 24 Stunden in-vitro-Kultivierung war der degenerierte Inhalt dieser Eizellen verklumpt und hatte sich retrahiert (Abb. 4.d).

Aus 39 Eizellen der Kontrollgruppe hatten sich 29 (74,4 %) junge Blastozysten entwickelt (Tabelle 7).

Untersuchungen über die Tiefgefriertauglichkeit junger Blastozysten unter gleichen Versuchsbedingungen führten ebenfalls zu negativen Ergebnissen. Entwickelten sich 23 (79,3 %) von 29 Eizellen der Kontrolle weiter, so waren 196 (79 %) nach dem Auftauen zurückgewonnene Zellen ohne Ausnahme zerstört worden. Die Gesamtzahl der eingefrorenen Blastozysten betrug 202 (Tabelle 7). Das Erscheinungsbild der Zellen nach weiteren 24 Stunden Brutschrankaufenthalt entsprach dem der degenerierten 8-Zell-Stadien.

3.2.2. Methode II

Die auf diese Art tiefgefrorenen Eizellen entsprachen in bezug auf Stadium und Herkunft denjenigen bei Methode I. In zwei Versuchen wurden 71 8-Zeller auf -79°C abgekühlt. Keine der 65 (91,6 %) zurückgewonnenen Zellen hatte die Kältebehandlung unbeschadet überstanden. Lediglich fünf erschienen innerhalb der ersten 30 Minuten morphologisch unverändert. Wenig später jedoch erfolgten der Zerfall und die gegenseitige Vermischung der Blastomeren. Nach einem Tag in-vitro-Kultivierung war in allen Fällen die schon erwähnte Verklumpung und Retraktion eingetreten. Der Prozentsatz der weiterentwickelten Kontrollzellen betrug 86,4 (19 von 22; Tabelle 7).

Ein anschließender Versuch mit 18 jungen Blastozysten, von denen 17 (94,4 %) nach dem Auftauvorgang beurteilt

TABELLE 7: ERGEBNISSE DER VERSUCHE NACH METHODE I UND II

Methode	Zell- stadium	A N Z A H L D E R E I Z E L L E N					
		<u>Tiefgefrierkonservierung</u>				<u>Kontrolle</u>	
		eingefr.	zurückgew.	weiterentw.	kultiv.	weiterentw.	
I	8	160	135 (84,4 %)	---	39	29 (74,4 %)	
	junge Blastoz.	202	196 (97 %)	---	29	23 (79,3 %)	
II	8	71	65 (91,5 %)	---	22	19 (86,4 %)	
	junge Blastoz.	18	17 (94,4 %)	---	5	4 (80 %)	

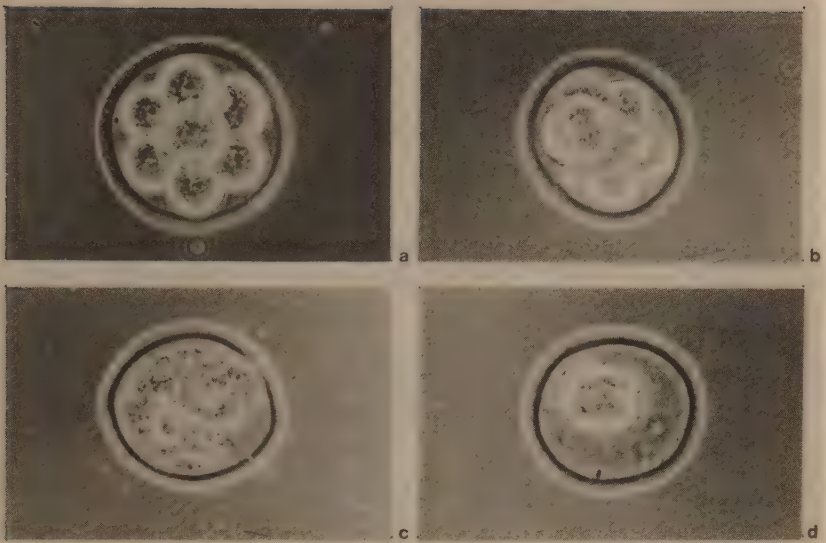


Abb. 4 a und b: 8-Zell-Stadien (66 - 68 Std. nach HCG gewonnen); c: degeneriertes 8-Zell-Stadium unmittelbar nach Tiefgefrierkonservierung nach Methode I; d: wie c, nach weiteren 24 Stunden Brutschrankkultivierung

Optische Vergrößerung:

16 x 2,0 x 3,2 (bei a)

16 x 1,6 x 3,2 (bei b, c und d)

(Objektiv x Optovar x Gerätefaktor)

werden konnten, erbrachte ebenfalls keine positiven Resultate. Von den fünf unbehandelten Eizellen entwickelten sich vier weiter (Tabelle 7).

3.2.3. Methode III

Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Insgesamt wurden 25 Versuche mit 2-Zell- und 8-Zell-Stadien durchgeführt. Zunächst wurden in sechs Fällen 167 Zellen der jüngeren Entwicklungsstufen (Abb. 5.a) hinsichtlich ihrer Tiefgefriertauglichkeit überprüft. Nach dem Auftauen konnten davon 153, das sind 91,6 %, wiedergefunden werden (Abb. 5.b). Etwa 48 Stunden später hatten 92 Zellen (60,1 %) das Stadium der jungen Blastozyste erreicht. Der Prozentsatz augenscheinlich degenerierter Eizellen unmittelbar nach der Rückgewinnung betrug 15 (23 von 153). Keiner der so beschaffenen 2-Zeller teilte sich in-vitro weiter. Zur letztgenannten Gruppe gehörten nicht die Zellen mit nur einem degenerierten Blastomer (Abb. 5.c), da deren Entwicklungsfähigkeit in der Mehrzahl der Fälle (56,5 %) erhalten geblieben war. 23 der erwähnten 153 Eizellen zeigten diesen Teildefekt.

Von den 48 2-Zellern der unbehandelten Kontrollgruppe erreichten 43 (89,6 %) das Blastozystenstadium (Abb. 5.d).

Anschließend sind in 19 Versuchen 534 Zellen der älteren Stadien eingefroren und 505 (94,6 %) davon zurückgewonnen worden (Abb. 6.a). Während der folgenden 24 Stunden im Brutschrank zeigten 407 (80,6 %) Eizellen unverminderte Entwicklungsfähigkeit. Waren unmittelbar nach dem Auftauvorgang 11,1 % (56) der 505 8-Zeller augenscheinlich degeneriert und nicht mehr teilungsfähig, so entstanden aus 83 teilzerstörten Zellen (Abb. 6.b) 71 (85,5 %) junge Blastozysten. (Diese Aussage bezieht sich auf 8-Zell-Stadien, die zumindest noch vier morphologisch unveränderte Blastomeren besaßen.

Alle 157 Zellen der Kontrollgruppe erreichten das Blastozystenstadium.

TABELLE 8: ERGEBNISSE DER VERSUCHE NACH METHODE III

Zell- stadium	A N Z A H L D E R E I Z E L L E N					
	Tiefgefrierkonservierung			Kontrolle		
	eingefr.	zurückgew.	weiterentw.	kultiv.	weiterentw.	
2	167	153 (89,6 %)	92 (60,1 %)	48	43 (89,6 %)	
8	534	505 (94,6 %)	407 (80,6 %)	157	157 (100 %)	
8 *	32	30 (93,8 %)	---	4	4 (100 %)	

* Versuch mit vergrößerter Kühlgeschwindigkeit

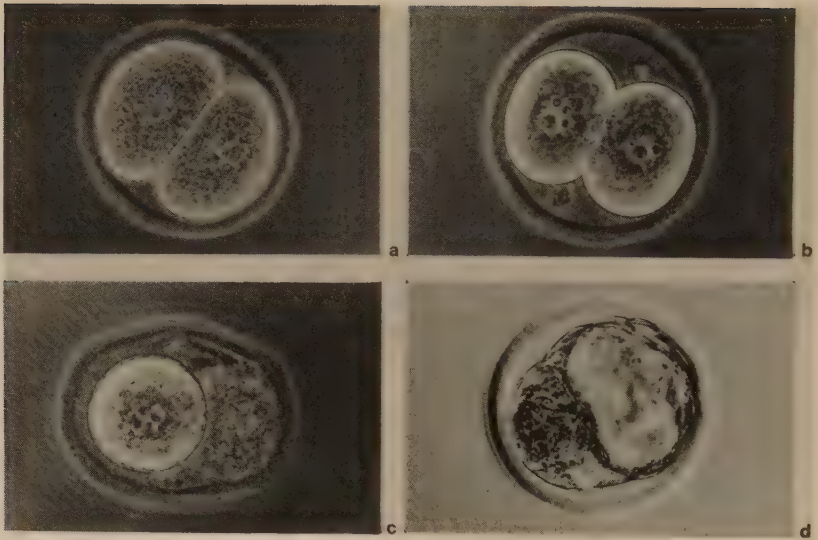


Abb. 5 a: 2-Zell-Stadium (46 - 48 Std. nach HCG gewonnen); b: morphologisch unversehrtes 2-Zell-Stadium unmittelbar nach Tiefgefrierkonservierung nach Methode III; c: teilzerstörtes 2-Zell-Stadium unmittelbar nach Tiefgefrierkonservierung nach Methode III; d: junge Blastozyste, die sich nach 48 Std. Brutschrankkultivierung aus einem 2-Zell-Stadium entwickelt hat

Optische Vergrößerung:

16 x 2,0 x 3,2

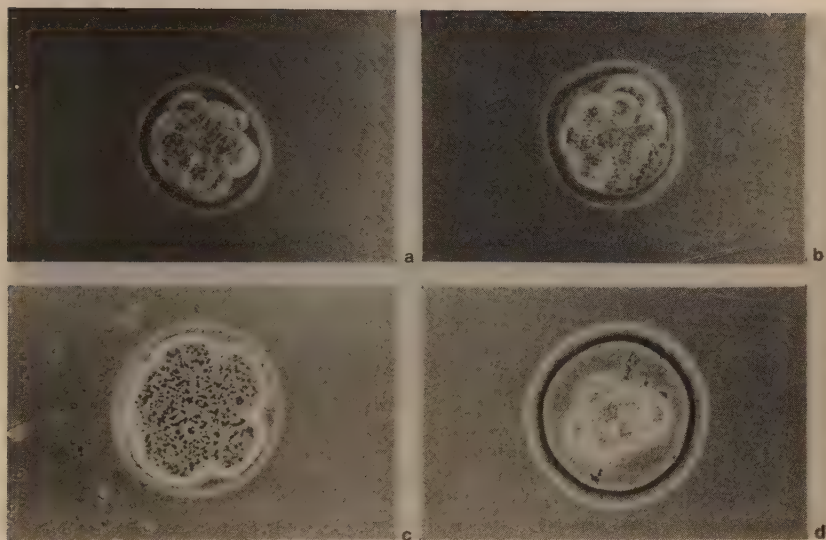


Abb. 6 a: morphologisch unversehrtes 8-Zell-Stadium unmittelbar nach Tiefgefrierkonservierung nach Methode III; b: teilzerstörtes 8-Zell-Stadium unmittelbar nach Tiefgefrierkonservierung nach Methode III; c: degeneriertes 8-Zell-Stadium unmittelbar nach Tiefgefrierkonservierung nach Methode III bei vergrößerter Kühlrate ($3,8^{\circ} \text{C/min}$); d: wie c, nach weiteren 24 Std. Brutschrankkultivierung

Optische Vergrößerung:

16 x 1,25 x 3,2 (bei a und b)

16 x 1,6 x 3,2 (bei c und d)

In einer abschließenden Untersuchung mit 32 8-Zellern, bei denen die Kühlgeschwindigkeit etwa fünffach vergrößert war, degenerierten die 30 (93,8 %) zurückgewonnenen ohne Ausnahme (Abb. 6.c und 6.d).

Die vier Eizellen der Kontrollgruppe entwickelten sich normal weiter.

Der Vergleich der Tiefgefriertauglichkeit befruchteter Mäuseeizellen fällt deutlich zugunsten der älteren Stadien aus. Der Anteil an Eizellen, die den Konservierungsprozeß unbeschadet überstanden, war bei den 8-Zellern signifikant höher als bei den 2-Zellern ($P \leq 0,01$). Die statistische Sicherung dieses Unterschiedes erfolgte durch den χ^2 -Test.

3.2.4. Rücktransplantation

Die Gewichtszunahme des Empfängertieres, das am Tag der Transplantation 34 g wog, betrug bis zur Geburt von fünf Jungtieren am 20. Tag der Trächtigkeit insgesamt 16 g.

Da die Geburt zwischen 3.00 und 8.00 Uhr stattgefunden haben mußte, waren die Jungen entweder tot zur Welt gekommen oder in der Zeit bis zu ihrem Auffinden gestorben. Alle Tiere des Wurfes hatten dunkel pigmentierte Augen und zeigten keine äußerlich sichtbaren Fehlbildungen (Abb. 7). Im rechten Uterushorn des getöteten Muttertieres befanden sich in gleichmäßigen Abständen voneinander über die ganze Hornlänge verteilt fünf fast kreisrunde Plazentationsstellen mit einem Durchmesser von etwa drei bis vier Millimetern. Zum Vergleich wurde der Uterus einer Maus eröffnet, die am gleichen Tag neun Tiere geboren hatte. Die Erscheinungsbilder der Plazentationsstellen wichen in Form, Größe und Farbe nicht voneinander ab.

Die dunkle Augenfarbe der aus den transplantierten, zuvor tiefgefrorenen Eizellen entstandenen Früchte konnte im Vergleich zu den pigmentlosen Augen albinotischer Jungtiere (NMRI x NMRI) deutlich dargestellt werden (Abb. 7 und 8).



Abb. 7 Wurf von fünf Jungtieren mit dunkel pigmentierten Augen. Ergebnis der Transplantation tiefgefrorener, befruchteter Mäuseeizellen

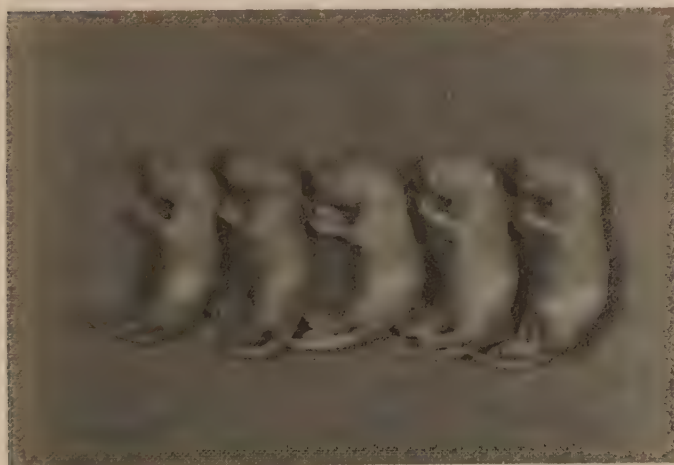


Abb. 8 Wurf von fünf Jungtieren albinotischer Elterntiere (NMRI). Die Augen sind unpigmentiert

Der Pigmentunterschied ist in der Originalarbeit, die in der Bibliothek des Fachbereichs Tiermedizin aufliegt, durch ein Farbphoto belegt.

3.2.5. Chromosomenanalyse

Etwa 330 junge Blastozysten wurden zur Darstellung ihrer Chromosomen aufgearbeitet. Ungefähr ein Drittel dieser Eizellen entstammte den unbehandelten Kontrollgruppen. Aus den tiefgefrorenen Zellen ließen sich 12 auswertbare Mitosen darstellen (Abb. 9). Bei dem Vergleich dieser Chromosomenkomplemente mit denen der lediglich *in-vitro* kultivierten 8-Zell-Stadien (8 Mitosen) konnten keine morphologischen Anomalien festgestellt werden (Abb. 10). Numerisch veränderte Chromosomensätze wurden nicht beobachtet.

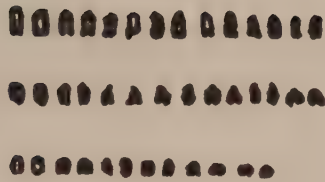


Abb. 9a Chromosomenkomplement einer tiefgefrorenen, befruchteten Mäuseeizelle

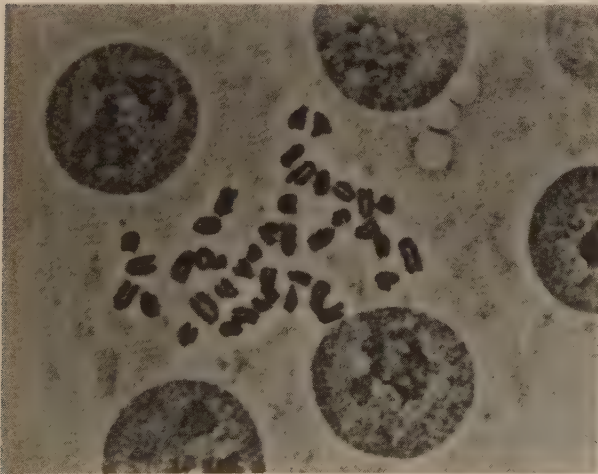


Abb. 9b Die zu Abbildung 9a gehörige Metaphase

Optische Vergrößerung:

100 x 1,25 x 3,2 (bei 9a und 9b)

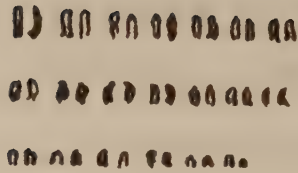


Abb. 10a Chromosomenkomplement der befruchteten Mäuseeizelle einer Kontrollgruppe

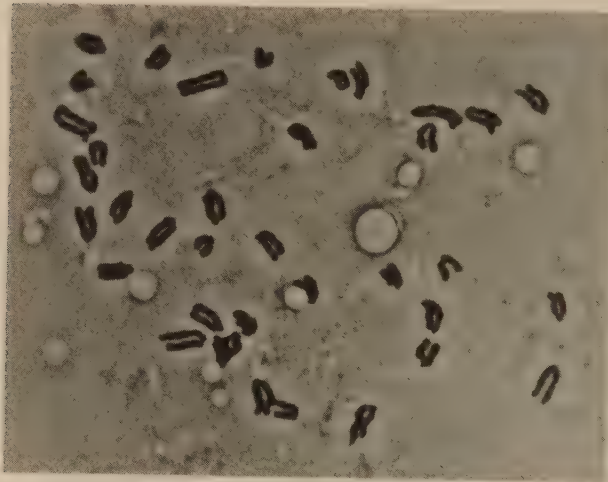


Abb. 10b Die zu Abbildung 10a gehörige Metaphase

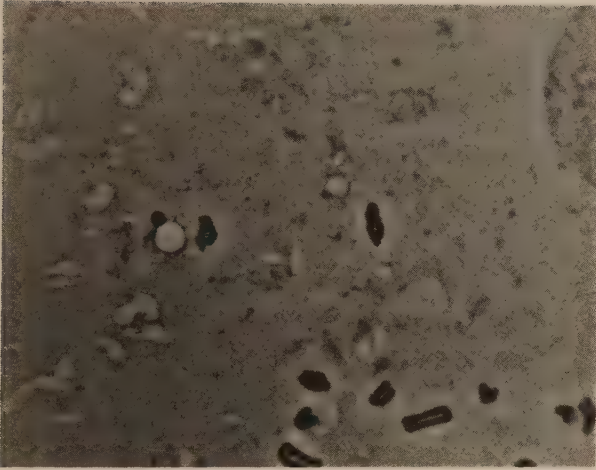


Abb. 10c Die zu Abbildung 10a gehörige Meta-
phase als Anschlußaufnahme zu 10b

Optische Vergrößerung:

100 x 1,25 x 3,2 (bei 10a, 10b und 10c)

4. Diskussion

Seit Beschreibung der in-vitro-Kultivierungsmethoden für Mäuseeizellen durch BRINSTER (1963) ist diese Art der Aufbewahrung bis heute in unveränderter Form immer wieder als Methode der Wahl angesprochen und in einschlägigen Untersuchungen übernommen worden.

BRINSTER schlägt die Verwendung von equilibriertem Paraffin zur Überschichtung des die Eizellen enthaltenden Mediums vor. Die dadurch erzielte Sättigung des Öls mit anorganischen Komponenten des Mediums und mit dem zur mechanischen Vermischung eingeleiteten CO_2 -Gas verhindert nach Aussagen von RAFFERTY (1970) einmal das Entweichen von Kohlendioxid aus dem Nährmedium, zum anderen aber auch die Lösung anorganischer Komponenten im Paraffin. Der pH-Wert und die Konzentration der Mediumbestandteile können so in tolerierbaren Grenzen gehalten werden.

Zudem wurde das gebrauchsfertige Medium einige Tage vor seiner Verwendung in einer Gasatmosphäre von 5 % CO_2 in Luft gelagert. Die Atmosphäre innerhalb des Brutschranks während der eigentlichen Kultivierung war von dem gleichen Gasgemisch bestimmt (BRINSTER, 1963).

Aus einer kurzen Bemerkung von WHITTINGHAM (1971b), die sich auf unveröffentlichte Erfahrungen von WHITTINGHAM und WALES beziehen, geht hervor, daß die Equilibrierung des Paraffins vor seiner Verwendung für die Weiterentwicklung von 2-Zell-Stadien nicht erforderlich ist.

Die im Verlauf der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse können diese wenig detaillierte Aussage nicht nur in dieser Richtung unterstützen, sondern stellen zugleich die Notwendigkeit der Verwendung von CO_2 -Gas in irgendeiner Phase der in-vitro-Kultivierung in Frage. Die umfangreiche Vorbereitung der Eizellkultivierung nach der Methode von BRINSTER ist wohl deshalb notwendig, weil im Verhältnis zum Paraffinvolumen (10 ml) so geringe Mengen Medium (0,1 ml) verwendet wurden, und daher die Lösung eines relativ großen Anteils anorganischer Bestandteile

der Nährflüssigkeit im Paraffin wahrscheinlich erscheint. Die eigenen Versuche jedoch zeigten durch Verschiebung der Volumina (Paraffin : Medium, 2 : 1), daß die auch sicher hierbei stattfindende Lösung in den Grenzen bleibt, die eine Weiterentwicklung der Eizellen nicht beeinträchtigt. Da hier aber zudem auf eine vorausgehende CO_2 -Begasung des gebrauchsfertigen Mediums sowie auf eine speziell eingestellte Kohlendioxidatmosphäre im Brutschrank verzichtet wurde, kann in dieser Art der Vorbereitung auch bei dem Verfahren nach BRINSTER kein Vorteil gesehen werden.

Auf die ausschließliche Verwendung des Penicillins in Form seines Kaliumsalzes wiesen mehrere Autoren ohne Begründung hin (BRINSTER, 1965a; WHITTINGHAM und BIGGERS, 1967; WHITTINGHAM, 1968, 1971a; WHITTEN und BIGGERS, 1968). Durch den erfolgreichen Einsatz eines Penicillin-Kalium-Natrium-Gemisches, in dem die Anteile des Natriums stark überwogen, konnte diese Forderung nicht unterstützt werden.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Erfolge der in-vitro-Kultivierung von 2- und 8-Zellern (Tabelle 7 und 8) liegen nahe den in der Literatur angegebenen größten Entwicklungsprozentsätzen bzw. weit darüber. Für 2-Zeller wurden 72 % (WHITTINGHAM und WALES, 1969) und 83 % (GATES, 1965) angegeben. Die von WILMUT (1972) genannte Zahl über die prozentuale Weiterentwicklung von 8-Zellern ist 84. Ein Vergleich aller aufgeführten Ergebnisse ist aber schon wegen der unterschiedlichen Kultivierungsmethoden nicht möglich. Da wiederholt der günstige Einfluß des Hybridisierungseffektes erwähnt wurde (GATES, 1965; WHITTEN und BIGGERS, 1968), sollen hier die eigenen Ergebnisse nach diesem Gesichtspunkt aufgeführt werden.

Die 8-Zell-Stadien der Kontrolle bei Methode I und II erreichten zu 78,6 % das Stadium der Blastozyste. Wie bei WILMUT (1972) handelte es sich um Eizellen aus der Paarung ingezüchteter Stämme. Die verschiedenen großen Erfolge lassen sich, abgesehen von den in-vitro-Kultivierungsformen, wegen der Verwendung unterschiedlicher Tierrassen

nicht direkt vergleichen, weil die Eignung von Eizellen zur Kultivierung auch rasseabhängig zu sein scheint (GATES, 1965; WHITTINGHAM und WALES, 1969).

Die aus hybrider Paarung hervorgegangenen 8-Zeller der Kontrolle bei Methode III entwickelten sich völlig über- raschend zu 100 % weiter. Damit stellt sich die Frage, ob der Heterosiseffekt alleine einen so deutlichen Erfolgs- unterschied erklären kann oder ein nicht zu unterschät- zender "Übungseffekt" im Umgang mit Eizellen hinzukommt. Die Versuche nach Methode I und II liegen zeitlich einige Monate vor denen nach Methode III. Die Manipulationen, angefangen von der Eigewinnung bis hin zur Kultivierung liefen mit fortschreitender Übung immer reibungsloser ab. Die Verweildauer der Eizellen bei subnormalen Temperatu- ren und der gleichzeitige Kontakt mit reichlich viel Zelltrümmern bzw. Gewebsteilen, sowie die intensive Lichteinwirkung unter dem Mikroskop wurden im Laufe auf- einanderfolgender Untersuchungen zeitlich immer mehr ein- geschränkt. Parallel damit konnte ein negativer Einfluß von dieser Seite verringert werden.

Bewirkt die Zimmertemperatur alleine auch nach Aussagen mehrerer Autoren (RUNNER und PALM, 1963; WALES und BIG- BERS, 1968; BRINSTER, 1969a) keine Schäden an den Eizel- len, so ist nicht auszuschließen, daß zusammen mit dem ungünstigen Einfluß von Gewebsteilen und Flüssigkeiten aus Uterus und Ovidukt (BRINSTER, 1969a) sowie durch die Lichteinwirkung das die Eizellen umgebende Milieu verän- dert wird.

Bei dem Vergleich der Weiterentwicklung von 2- und 8-Zel- lern, die beide hybrider Paarung entstammen (Kontroll- gruppen der Versuche nach Methode III), hebt sich der ma-ximale Erfolg mit den älteren Stadien deutlich ab. Es bleibt jedoch zu bedenken, daß durch eine natürliche Se- lektion in-vivo das Ergebnis zugunsten der 8-Zeller be- einflußt sein kann. Diese Vermutung stützt sich auf die Tatsache, daß sich die durchschnittliche Anzahl superovu- lierter Eizellen, die vom Tag 2 bis zum Tag 4 der Träch-

tigkeit aus dem Geschlechtstrakt gewonnen werden können, signifikant ($P \leq 0,01$) verringert. Wahrscheinlich waren am Tag 2 noch Eizellen zu gewinnen, die in der folgenden Zeit degeneriert wären. Am Tag 4 sind solche Formen nicht mehr auffindbar (ALLEN und MCLAREN, 1971). In diesem Zusammenhang ist auch ein Unterschied zwischen dem idealen Milieu innerhalb des weiblichen Genitale und dem des Kulturmediums wahrscheinlich. Trotz der Entwicklung verfeinerter Kultivierungsmethoden und Verbesserung der verwendeten Kulturmedien ist das in-vitro-Milieu wohl als weniger vorteilhaft zu beurteilen als das der Reproduktionsorgane (BOWMAN und MCLAREN, 1970).

Eine ergänzende Anmerkung zu diesem Fragenkomplex wird von Tervit und Rowson (1974) gegeben. Die geringere Entwicklungsfähigkeit jüngerer Zellstadien in-vitro könnte Ausdruck ihrer relativ längeren Aufenthaltsdauer außerhalb des weiblichen Genitale und somit unabhängig vom Alter bei Beginn ihrer Kultivierung sein.

Unter Anführung dieser theoretischen Erwägungen können die Resultate der eigenen Untersuchung besser interpretiert werden.

Die von Whittingham (1971a) berichteten Erfolge bei der Tiefgefrierkonservierung befruchteter Mäuseeizellen nach dem Prinzip der plötzlichen Abkühlung (Sturzkühlung) boten sich wegen der Einfachheit des Verfahrens und der Schnelligkeit in der Durchführung der Versuche zur Überprüfung an. Da die Reproduktion der Ergebnisse mit dieser Methode in der vorliegenden Arbeit (Methode I) jedoch scheiterte, werden die Ergebnisse des genannten Autors zunächst unverständlich.

Die Beobachtung der Zerstörung schnell eingefrorener Kanincheneizellen machten aber schon Smith (1952) und Ferdows und Mitarbeiter (1958). Eine Degeneration war nur dann vermeidbar, wenn die Kühlraten sehr niedrig lagen. Der Grund für diese Tatsache schien vorläufig unbekannt.

Auf die Bedeutung der Wasserabgabe aus dem zu gefrierenden Objekt und der damit verbundenen Verhinderung intrazellulärer Eisbildung bei langsamer Abkühlung wiesen MERYMAN (1956) und SHERMAN und LIN (1958b) hin. Das Eis innerhalb der Zelle war Ursache irreversibler Schäden. Da die Wasserdurchlässigkeit der Zellmembran (hier die der Zona pellucida) und gleichzeitig das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen die Schnelligkeit der Abgabe freien Wassers aus der Zelle beeinflussen, ist von dieser Seite die Kühlgeschwindigkeit festgelegt (MAZUR, 1963, 1966, 1970). Relativ große, kugelige Zellen (Eizellen) besitzen in bezug auf ihre Volumina eine geringere Oberfläche als kleinere Zellen. Das freie Wasser der Eizelle kann demzufolge nur langsam abgegeben werden. Diese Tatsache legt die Abkühlgeschwindigkeit, welche eine interne Eisbildung verhindert, auf ein niedriges Maß fest. Die Verwendung einer Kühlrate von über 80°C/min in den Versuchen nach Methode I trägt der nur langsam ablaufenden Dehydrierung der Eizellen nicht Rechnung und ermöglicht die Entstehung von intrazellulärem Eis, das die Zelle mechanisch zerstört.

Bei der Darstellung der Schadwirkung infolge zu schneller Abkühlung muß auch die Erscheinung der Rekristallisation beim Auftauvorgang berücksichtigt werden. Dieses Größenzwachstum der Eiskristalle tritt immer dann ein, wenn schnell gefrorene Objekte wieder aufgetaut werden. Dem daraus entstehenden Schaden messen LEIBO und Mitarbeiter (1970) größere Bedeutung zu als dem Vorhandensein von intrazellulärem Eis.

Da man diese beiden Störfaktoren bisher nicht getrennt voneinander darstellen konnte, ist auch eine additive Wirkung nicht auszuschließen.

Ob und inwieweit die toxische Komponente des PVP (ASH-WOOD-SMITH und WARBY, 1971; WILMUT, 1972) an der Degeneration der Eizellen mitbeteiligt war, kann hier nicht entschieden werden. Fest steht jedenfalls, daß nach dem Sammeln der aufgetauten Eizellen bis zum ersten Waschvor-

gang in 2,5 ml PBS eine höhere als 2 %ige Konzentration der Gefrierschutzsubstanz auf 8-Zeller und Blastozysten einwirken konnte. Obwohl eine 1 %ige Lösung von PVP erst bei längerem "Kontakt" mit Eizellen Schäden hervorruft (WHITTINGHAM, unveröffentlicht) ist es denkbar, daß sich die doppelte Konzentration in relativ kurzer Zeit entsprechend auswirkt.

Die Frage nach der Eignung von PVP als Schutzsubstanz zur Tiefgefrierung befruchteter Eizellen kann vermutlich erst dann beantwortet werden, wenn der ebenfalls störende Faktor der internen Eisbildung ausgeschaltet ist. Durch die stark verringerte Abkühlgeschwindigkeit (ca. 1°C/min) während der Versuche nach Methode II und die auch hierbei erzielten, ausnahmslos negativen Resultate, könnten vor- schnell zu der Annahme verleiten, daß PVP keinerlei Schutzwirkung besitzt. Die hier eingesetzte, spezielle Versuchsanordnung gestattet jedoch eine solche Aussage nicht. Die Eisbildung beim Einfrieren der Eizelle trat spontan ein, und die damit freiwerdende Kristallisations- wärme erhöhte die Temperatur des Inhalts der Gefrier- röhren schnell auf etwa 0°C . Nach ungefähr 5 Minuten glich sich die Temperatur der erstarrten Medien ebenso rasch wieder der der kälteren Umgebung an. Es ist also nicht von der Hand zu weisen, daß dieser begrenzte Temperatur- sturz zu einer Zeit erfolgte, als die Dehydrierung der Zellen noch nicht abgeschlossen war. Das in der Zelle verbliebene freie Wasser könnte durch die Kristallisation beim Wechsel des Aggregatzustandes die Zellstrukturen ge- schädigt haben. Auf diese, während des Versuchsablaufs eintretenden Ereignisse wies MAZUR (1966) hin und be- schrieb ihre zerstörende Wirkung auf Hefezellen, die tiefgefroren wurden. War hingegen die Eisbildung bei -2°C induziert worden, konnten die Schäden verhindert werden.

Die von WILMUT (1972) durchgeführten Untersuchungen mit nicht toxisch wirkendem, dialysiertem PVP lassen an der Eignung dieser Schutzsubstanz für die Tiefgefrierkonser-

vierung befruchteter Mäuseeizellen zweifeln. Eine Erklärung für diese negativen Ergebnisse bei Verwendung von PVP gab der Autor nicht.

LOVELOCK (1954b) spricht allen Substanzen, die nicht ins Zellinnere gelangen können (z. B. PVP), eine Schutzwirkung während des Tiefgefrierens ab. SHERMAN (1963) und PERSIDSKY und RICHARDS (1963) erbrachten jedoch den Nachweis, daß der Schutz außerhalb der Zelle völlig ausreichend ist. Die beschriebene Versuchsanordnung der Methode III, bei der das Eindringen von DMSO durch seine Zugabe bei 0° C kaum Eingang in die Eizellen gefunden haben konnte (WHITTINGHAM und Mitarbeiter, 1972), unterstreicht aufgrund der guten Konservierungsergebnisse die Aussage der zuletzt genannten Autoren.

Die sehr geringe osmotische Wirkung des PVP (WILMUT, 1972; MAZUR und Mitarbeiter, 1969), die vermutlich die schnellstmögliche Dehydrierung der Eizellen verhindert, könnte eine der vielen, heute noch nicht überschaubaren Ursachen für den erfolglosen Einsatz dieser Substanz in der Gefrierkonservierung befruchteter Mäuseeizellen sein. Zur Überprüfung der Richtigkeit dieser Vermutung müßten Kühlraten gewählt werden, die einen vollständigen Austritt freien Wassers ermöglichen und so das Fehlen osmotischer Wirkung der Schutzsubstanz ausgleichen.

Die Tatsache, daß einige Eizellen der Versuche mit drastisch verminderter Abkühlgeschwindigkeit (Methode II) nach ihrem Auftauen relativ kurze Zeit morphologisch unverändert erschienen, mag auf die Notwendigkeit langsamer Kühlung hinweisen. Eine allgemeingültige Aussage ist jedoch aufgrund des geringen Zahlenmaterials nicht möglich.

Wiederholt wird auf die bisher nicht erwähnte Schutzwirkung durch die beim Gefriervorgang kontinuierlich ansteigende Salzkonzentration innerhalb und außerhalb der Zelle hingewiesen (LOVELOCK, 1954b; MERYMAN, 1956; MAZUR, 1963, 1966, 1970; LEIBO und Mitarbeiter, 1970). Obwohl die sich konzentrierenden Lösungen bei langsamer Abkühlung länger auf die Eizelle einwirken als bei beschleunigtem Tempera-

turabfall, scheint dieser Einfluß im Fall der Versuchsreihe nach Methode III keine wesentliche Rolle zu spielen. Von der induzierten Eisbildung bei -4°C bis zur Abkühlung auf -10°C - ab hier vermindert sich das chemische Potential (Denaturierung) logarithmisch (MERYMAN, 1956) - vergehen etwa 10 Minuten. Die intrazelluläre Konzentration dort normal vorkommender Elektrolyte kann, da das DMSO wegen seines Zusatzes bei 0°C nicht oder nur in unwesentlichen Mengen in die Eizelle eingedrungen ist, nicht "gepuffert" (MERYMAN, 1956; SHERMAN, 1965; FARRANT, 1969) worden sein. Wie die hohen Überlebensraten und die erfolgreiche Rücktransplantation zeigen, ist diese Tatsache unbedeutend. Außerhalb der Eizelle verringert die vorhandene Schutzsubstanz die dort bei Eisbildung schnell steigende Elektrolytkonzentration. DMSO ist völlig wasserlöslich (DOEBBLER, 1966), d. h. bindet eine gewisse Menge freien Wassers, das den Salzen als Lösungswasser dient und bleibt gleichzeitig durch seine Einfügung in die Molekularstruktur des Wassers bis etwa -70°C flüssig (RASMUSSEN und MCKENZIE, 1968).

Entscheidend für die erfolgreiche Tiefgefrierkonservierung ist vermutlich eine ausreichende Dehydrierung.

An diesem Vorgang sind wahrscheinlich drei Kräfte maßgeblich beteiligt:

- a der von MAZUR (1963, 1966, 1970) beschriebene unterschiedliche Dampfdruck zwischen Zellinnerem und -äußerem als treibende Kraft bei einsetzender Eisbildung,
- b die starke osmotische Wirkung des DMSO (WILMUT, 1972), die schon vor Eisinduzierung (bei -4°C) bewirkt, daß das freie Wasser aus der Zelle austritt und
- c die dehydrierende Wirkung der mit fortschreitendem Eiskristallwachstum steigenden Elektrolytkonzentration, auf die schon MERYMAN (1956) hinwies.

Abgesehen von der unter b genannten Eigenschaft des DMSO sind seine bereits weiter oben aufgeführten Fähigkeiten und die fast selbstverständlich erscheinende, fehlende

Toxizität bei den verwendeten Konzentrationen Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz bei der Tiefgefrierkonservierung.

In der stark dehydrierenden Eigenschaft des DMSO sahen WHITTINGHAM und WALES (1969) den Nachteil der Schutzsubstanz und beschrieben irreversible Schäden als Folge der Schrumpfung von Eizellen, die dann auftrat, wenn diese Flüssigkeit bei $+20^{\circ}\text{C}$ direkt in Kontakt mit den Eizellen trat. Die Temperatur, bei der die Zugabe des DMSO erfolgt, spielt vermutlich eine entscheidende Rolle, denn die Ergebnisse von WHITTINGHAM und Mitarbeitern (1972) und die der vorliegenden Arbeit zeigen, daß der direkte Kontakt bei 0°C keine wesentlichen negativen Einflüsse hatte. Um die zweite, von WILMUT (1972) beschriebene, zeitabhängige Schädwirkung gering zu halten, wurde beim Wiederauftauen der Eizellen schon früh, bei 0°C , mit der Verdünnung des DMSO begonnen. So war zu erwarten, daß das in die Zelle zurückfließende Wasser nicht eine zu große Menge Schutzsubstanz mitführen würde. Die stufenweise Zuführung von Medium sollte einen plötzlichen, starken osmotischen Druckunterschied verhindern.

Die Frage, ob tatsächlich die von allen Seiten wiederholte Forderung nach extrem langsamer Abkühlung derart streng auszulegen sei, konnte durch das Ergebnis des letzten Versuches nach Methode III (Kühlrate $3,8^{\circ}\text{C/min}$) bejaht werden. Stützt sich diese Aussage auch auf eine relativ geringe Anzahl von Versuchsobjekten, so ist zumindest die Notwendigkeit einer langsamen Temperatursenkung angedeutet. Ab etwa 4°C/min waren keine entwicklungsfähigen Eizellen mehr zu beobachten. WILMUT (1972) hingegen gelang es, junge Mäuseblastozysten im geringen Umfang bei drastisch erhöhter Kühl- und Auftaurate (23° und 360°C/min) erfolgreich zu konservieren. Allerdings muß hinzugefügt werden, daß die DMSO-Konzentration 2 molar war. Bei Verwendung einer 1,5 molaren Lösung jedoch überlebte keine Eizelle, obwohl die Kühlrate jetzt auf

4,7° C/min verringert war. Nach den Ergebnissen von WILMUT (1972) und den Erfahrungen bei den eigenen Versuchen ergibt sich zwischen noch verträglicher Kühlrate und molarer Konzentration der Schutzsubstanz ein direkter Zusammenhang. Bei niedriger molarer Konzentration der Schutzsubstanz muß die Temperatursenkung pro Zeiteinheit geringer sein als bei höheren molaren Konzentrationen, wobei der zytotoxische Effekt des DMSO eine Grenze nach oben setzt. Der optimale Kompromiß zwischen den genannten Größen ist bis heute noch nicht definiert.

Ein Vergleich der Versuche der vorliegenden Arbeit mit den Ergebnissen von WHITTINGHAM und Mitarbeitern (1972) ist nicht möglich. Zwar wurden in beiden Fällen ähnliche Gefrierkonservierungsmethoden angewendet, die Kühl- und Auftauraten bei WHITTINGHAM und Mitarbeitern (0,3° C / 0,5° C und 4° C / 25° C/min) und bei den eigenen Versuchen (0,7° C und 7,0° C/min) sind jedoch unterschiedlich. Zudem sind die Formen der Brutschrankkultivierung völlig verschieden.

Da WILMUT (1972) seine Ergebnisse (Weiterentwicklung von Eizellen nach ihrer Rückgewinnung) auf die Anzahl der kultivierten und nicht auf die Gesamtzahl der zurückgewonnenen Eizellen bezieht, wie dies in den eigenen Versuchen geschah, können die angegebenen Prozentzahlen (Tabelle 1) nicht verglichen werden.

Um den Wert von Erfolgen bei der Tiefgefrierkonservierung objektiv erfassen zu können, muß man die Weiterentwicklung der aufgetauten auf die Anzahl aller zurückgewonnenen Eizellen beziehen. Je weiter sich dabei die zuletzt genannte Zahl der Anzahl eingefrorener Eizellen nähert, desto mehr Aussagekraft hat das Ergebnis. So ist in vorliegender Arbeit der Prozentsatz der 2-Zeller, die sich nach dem Auftauen zur Blastozyste weiterentwickelten (60,1), nicht so beweiskräftig - die "Rückgewinnungsquote" betrug 89,6 % - wie der Prozentsatz weiterentwickelter 8-Zeller (80,4), da diese nach dem Einfrieren in 94,6 % der Fälle wiedergefunden wurden.

Der Hinweis auf eine vermutlich bessere Eignung hybrider Paarung entstammender Eizellen zur in-vitro-Kultivierung ist eingangs der Diskussion bereits erfolgt. Aus dieser Sicht erscheint die Frage berechtigt, ob sich ein solcher Vorteil nicht auch in besseren Ergebnissen bei der Tiefgefrierkonservierung ausdrücken kann. Weiterhin kann die Brauchbarkeit der Eizellen für die Konservierung bei niedrigen Temperaturen auch von der Rasse abhängig sein. Die statistisch gesicherte unterschiedliche Tiefgefrier-tauglichkeit von 2- und 8-Zellern ist ein Phänomen, das bisher von keinem Autor beschrieben wurde. Bei der Suche nach einer Erklärung für diese Erscheinung konnten weder im Bereich der Physiologie praeimplantärer Mäuseeizellstadien (BRINSTER, 1965b, 1969a) noch in der Ultrastruktur dieser Zellen (CALARCO und BROWN, 1969) irgendwelche Hinweise gefunden werden. Es bleibt bisher nur die Möglichkeit, erneut auf die weiter oben vermuteten Gründe für die unterschiedliche Weiterentwicklung von 2- und 8-Zellern der Kontrollgruppen zu verweisen. Die natürliche Selektion in-vivo und das im Vergleich zum Reproduktionsorgan weniger ideale Milieu des Kulturmediums, verbunden mit der kürzeren Aufenthaltsdauer älterer Zellstadien außerhalb des weiblichen Genitale können das Ergebnis zugunsten der 8-Zeller beeinflußt haben.

Die sich aus dieser Sicht ergebende Konsequenz legt generell für Versuche über Tiefgefrieren und Transplantation von Eizellen die Verwendung solcher Zellstadien nahe, die schon in-vivo eine gewisse Selektion (ältere Eizellen) erfahren haben und gleichzeitig nach ihrem Auftauen durch eine deutlich sichtbare Gestaltsveränderung den ersten Anhalt unverminderter Weiterentwicklungsfähigkeit geben. Die natürliche Auslese und eine optisch erfaßbare Beurteilung weiterer Teilungen sind von den 8-Zell- und Moru-lastadien ab in ausreichendem Maße gegeben. Zugleich ist der Aufenthalt derartiger Eizellen in-vitro bis zur Rücktransplantation als junge Blastozysten kürzer als bei z. B. 2- oder 4-Zellern.

Die Übertragung tiefgefroreener und wieder aufgetauter, befruchteter Eizellen mit sich daraus entwickelnden Jungtieren stellt den entscheidenden Maßstab für die erfolgreiche Tiefgefrierkonservierung dar.

Der Beweis, daß die nach den Methoden der vorliegenden Arbeit mit Eizellen durchgeführten Manipulationen keine umfangreichen Schäden auslösten, konnte durch die Geburt von fünf Jungtieren mit dunkler Augenfarbe erbracht werden. Es bleibt aber die Frage offen, ob der Tod aller Früchte (siehe Seite 72) auf die Ursache innerer Fehlbildung als mögliche Spätfolge der Kältekonservierung oder auf die verweigerte Annahme des Wurfes durch das Muttertier zurückzuführen ist.

Auf eine Diskussion der Tatsache, daß sich 50 % der transplantierten Blastozysten zu Jungtieren weiterentwickelten, wird verzichtet, weil es sich nur um einen Fall handelt. Als grundsätzlicher Nachweis, daß die Tiefgefrierkonservierung ohne gravierende Auswirkung blieb, ist jedoch das Ergebnis geeignet, da sich allgemein nur weniger als 50 % der transplantierten Eizellen weiterentwickeln (RAFFERTY, 1970; WHITTINGHAM und Mitarbeiter, 1972; SCHNEIDER und Mitarbeiter, 1974).

Eine erfolgreiche Transplantation schließt aber einen genetischen Schaden durch die Tiefgefrierkonservierung und aller damit im Zusammenhang stehenden Maßnahmen nicht aus. So könnte das relativ geringe Weiterentwicklungsvermögen Übertragener Eizellen - 50 % oder weniger - Ausdruck von Schäden sein, die zu einem frühen Fruchttod führen. Für einen praktischen Einsatz der Gefrierkonservierung befruchteter Eizellen in der Tierzucht, wie es vor allem für das Rind diskutiert wird, ist die Frage eventueller genetischer Schäden von ausschlaggebender Bedeutung. Wenn irgendwelche Defekte solcher Art auftreten, die zu einem embryonalen Fruchttod führen, müßte auch in Erwägung gezogen werden, daß die aus tiefgefrorenen gewesenen, trans-

plantierten Eizellen entwickelten Früchte Träger chromosomaler bzw. genetischer Anomalien sein könnten, die erst in den folgenden Generationen offensichtlich werden würden.

Der erste Schritt zur Objektivierung eines Defektes beginnt mit der Suche nach grobmorphologischen Veränderungen und numerischen Abweichungen der Chromosomen an möglichst frühen Entwicklungsstadien.

Im Anschluß an die Tiefgefrierersversuche mit befruchteten Eizellen wurde deshalb nach dem Auftauen an den sich in der Kultur zu Blastozysten entwickelnden Stadien die Möglichkeit einer Chromosomendarstellung überprüft. Dabei wurde nicht angestrebt, das genetische Problem zu klären. Es sollte durch Modelluntersuchungen aufgeklärt werden, ob derzeit die technischen Voraussetzungen für die Bearbeitungen dieser Fragestellung gegeben sind.

Grundsätzlich ist es möglich, die Chromosomendarstellung auch nach dem Tiefgefrieren der Eizellen durchzuführen. Die Methode der Aufarbeitung von Blastozysten nach TARKOWSKI (1966) und MCFEELY (1966) ist geeignet, genügend Metaphasen einer Eizelle zu fixieren. Von etwa 225 tiefgefroren gewesenen bzw. ca. 105 Eizellen der Kultur wurden 13 bzw. 8 auswertbare Mitosen dargestellt. Die verhältnismäßig geringe Anzahl von Metaphasenkomenten war einmal die Folge gegenseitiger Überlagerungen, zum anderen einer großflächigen Zerstreuung von Chromosomen, die keine eindeutige Zuordnung zu einer Metaphase gestatteten. Es ist denkbar, daß eine Verfeinerung der Arbeitsgänge zu einer Verbesserung der Ergebnisse führen kann.

Die ausgewerteten Chromosomenkomplemente tiefgefroren gewesener Eizellen zeigten morphologisch keinen Unterschied zu denen unbehandelter Blastozysten der Kontrollgruppe. Geringfügig numerische Abweichungen von der normalen Chromosomenzahl ($2n = 40$) wie man sie z. B. als Folge fehlerhaft abgelaufener Meiosen und Mitosen kennt, wurden nicht beobachtet.

Eine Darstellung der Chromosomen gefrierkonservierter und anschließend aufgetauter Eizellen ist nicht möglich, wenn dieselben bereits während ihrer Kultivierung absterben. Eventuell vorhandene genetische Störungen werden somit nicht erfaßt. Weiterhin ist es denkbar, daß einige geschädigte Blastomeren als Teil des 8-Zell-Stadiums teilungsunfähig verharren, während die verbleibenden Blastomeren eine Blastozyste ausbildeten. Die an ihrer Reproduktion gehinderten Untereinheiten der geteilten Eizelle treten nicht mehr in die Metaphase ein und fallen ebenfalls für die Chromosomendarstellung aus.

Die Verwendung der Tiefgefrierkonservierung befruchteter Eizellen über rein experimentelle Belange hinaus in der Tierzucht wird davon abhängen, ob genetische Einflüsse durch dieses Verfahren gegeben sind oder nicht. Die hier aufgezeigte Chromosomendarstellung an tiefgefrorenen, befruchteten Eizellen ist ein Schritt zur Klärung dieser Frage.

Schlußfolgerung

Die Maus ist ein ideales Versuchstier, um grundsätzliche Phänomene bei der Tiefgefrierkonservierung junger Eizellstadien zu studieren. Voraussetzung dafür ist, alle Einzelschritte wie Superovulation, Eigewinnung, in-vitro-Handhabung, Kultivierung, Tiefgefrierkonservierung einschließlich des Auftauens und Rücktransplantation so erfolgreich miteinander zu verbinden, daß eine möglichst hohe Überlebensrate erzielt wird.

Mit den in dieser Arbeit dargestellten Verfahren konnte gezeigt werden, daß sich bis zu 80 % der nach dem Tiefgefrieren und Auftauen wiedergefundenen Eizellen zur Blastozyste weiterentwickelten. Die bisher nicht beschriebenen, hohen Überlebensraten nach dem Tiefgefrierprozeß lassen hoffen, daß diese Art der Konservierung befruchteter Eizellen auch bei landwirtschaftlichen Nutztieren möglich sein wird.

5. Zusammenfassung

Es wurde eine einfache Methode zur Tiefgefrierkonservierung befruchteter Mäuseeizellen erarbeitet, wobei Fragen der Superovulation, der Eigewinnung, der in-vitro-Manipulation, der Kultivierung und der Rücktransplantation mit einbezogen wurden.

Bei Verwendung der beschriebenen Methode der in-vitro-Kultivierung befruchteter Mäuseeizellen entwickelten sich 89,6 % der 2-Zell-Stadien bzw. 100 % der 8-Zell-Stadien nach 48 bzw. 24 Stunden Aufenthalt im Brutschrank zu jungen Blastozysten.

Nach langsamem Einfrieren, 2-stündiger Lagerung bei -196°C und langsamem Auftauen zeigten 60,1 % der 2-Zeller und 80,6 % der 8-Zeller eine Weiterentwicklung zur jungen Blastozyste (Differenz: $P \leq 0,01$).

Eine erfolgreiche Tiefgefrierkonservierung befruchteter Eizellen war nur durch sehr langsame Abkühlung ($0,7^{\circ}\text{C}/\text{min}$) zu erzielen. Eine erhöhte Kühlrate von $3,8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bewirkte, ebenso wie eine Sturzkühlung, die Zerstörung aller Eizellen.

Nach asynchroner Transplantation tiefgefrorener und wieder aufgetauter Eizellen entwickelten sich aus 10 übertragenen jungen Blastozysten 5 Jungtiere ohne äußerlich sichtbare Fehlbildungen.

Zur Untersuchung eventueller, genetischer Auswirkung der Tiefgefrierkonservierung befruchteter Eizellen kann die Chromosomendarstellung aus Blastozysten mit herangezogen werden. Bei Modelluntersuchungen zeigten sich im Vergleich zu Kontrollen an den Chromosomen wieder aufgetauter Zellstadien weder morphologische noch numerische Abweichungen.

Die Maus bietet als Modell alle Voraussetzungen zur Überprüfung der Probleme im Zusammenhang mit der Tiefgefrierkonservierung befruchteter Säugereizellen.

Die erfolgreiche Tiefgefrierkonservierung von Mäuseeizellen kann als Ausgangsbasis angesehen werden, diese Methode der Konservierung auch bei anderen Spezies zu erarbeiten.

Summary

A simple method for low temperature preservation of fertilized mouse ova was developed including the procedures of superovulation, recovery of ova, in-vitro-manipulation, cultivation, and transplantation.

Using the described method for in-vitro-cultivation of fertilized mouse ova 89.6 % of the 2-cell-stages and 100 % of the 8-cell-stages, maintained in an incubator for 48 and 24 hours, developed to early blastocysts.

After slow freezing, storing at -196°C for 2 hours, and slow rewarming 60.1 % of the 2-cell-stages and 80.6 % of the 8-cell-stages developed to early blastocysts ($p \leq 0.01$).

Only a very slow cooling rate (0.7°C/min) during deep freezing of fertilized ova yields high survival. Increasing of the cooling rate (3.8°C/min), just as very rapid cooling (36°C/min) did, led to ova damaging.

After asynchroneous transplantation of deep frozen and thawed ova a litter of 5 full-time fetuses without any detectable external deformation developed from 10 transferred blastocysts.

Chromosome preparations from blastocysts could be used in common to detect possible genetic alteration after low temperature preservation of fertilized ova. Basic examinations showed no differences in the chromosomes of na-

tive and thawed cells with respect to morphological or numerical status.

For investigations into the problems of low temperature preservation of fertilized mammalian ova, mouse as a model would be highly qualified.

Successful low temperature preservation of mouse ova would be a preliminary experiment for further application to other species.

6. Literaturverzeichnis

ALLEN J. und A. MCLAREN (1971)

Cleavage rate of mouse eggs from induced
and spontaneous ovulation

J. Reprod. Fert. 27 : 137

ASHWOOD-SMITH M. J. (1961)

Preservation of mouse bone marrow at
- 79° C with dimethylsulfoxide

Nature 190 : 1204

ASHWOOD-SMITH M. J. und C. WARBY (1971)

Studies on the molecular weight and cryo-
protective properties of polyvinyl-pyrro-
lidone and dextran with bacteria and ery-
throcytes

Cryobiology 8 : 453

AVERILL R. L. W. und L. E. A. ROWSON (1959)

Attempts at storage of sheep ova at low
temperatures

J. agric. Sci. 52 : 392

BEATTY R. A. (1951)

Transplantation of mouse eggs

Nature 168 : 995

BERGSTRÖM S. (1972)

Shedding of the Zona pellucida of the mouse
blastocyst in normal pregnancy

J. Reprod. Fert. 31 : 275

- BIGGERS J. D., MOORE B. D. und D. G. WHITTINGHAM (1965)
Development of mouse embryos in vivo after
cultivation from two-cell ova to blasto-
cysts in vitro
Nature 206 : 734
- BIGGERS J. D., WHITTINGHAM D. G. und R. P. DONAHUE (1967)
The pattern of energy metabolism in the
mouse oocyte and zygote
Proc. natl. Acad. Sci. 58 : 560
- BLANDAU R. J. (1969)
Gamete Transport-Comparative aspects
In: The mammalian oviduct
Eds.: HAFEZ E. S. E. und R. J. BLANDAU
The University of Chicago Press, Chicago
und London
- BRINSTER R. L. (1963)
A method for in vitro cultivation of mouse
ova from two-cell to blastocyst
Exp. Cell. Res. 32 : 205
- BRINSTER R. L. (1965a)
Studies on the development of mouse embryos
in vitro
I. The effect of osmolarity and hydrogen
ion concentration
J. exp. Zool. 158 : 49
- BRINSTER R. L. (1965b)
Studies on the development of mouse embryos
in vitro
II. Interaction of energy sources
J. Reprod. Fert. 10 : 227

BRINSTER R. L. (1969a)

In vitro cultivation of mammalian ova

Advances in the Biosciences 4 : 199

BRINSTER R. L. (1969b)

Mammalian embryo culture

In: The mammalian oviduct

Eds.: HAFEZ E. S. E. und R. J. BLANDAU

The University of Chicago Press, Chicago
und London

BOWMAN P. und A. MCLAREN (1970)

Cleavage rate of mouse embryos in vivo and
in vitro

J. Embryol. exp. Morph. 24 : 203

CALARCO P. G. und E. H. BROWN (1969)

An ultrastructural and cytological study of
preimplantation development of the mouse

J. exp. Zool. 171 : 253

CHANG M. C. (1947)

Normal development of fertilized rabbit ova
stored at low temperature for several days

Nature 159 : 602

CHANG M. C. (1948a)

The effects of low temperature on fertili-
zed rabbit ova in vitro, and the normal de-
velopment of ova kept at low temperature
for several days

J. Gen. Physiol. 16 : 841

CHANG M. C. (1948b)

Probability of normal development after
transplantation of fertilized rabbit ova
stored at different temperatures

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 68 : 680

CHANG M. C. (1948c)

Transplantation of fertilized rabbit ova:
The effect on viability of age, in vitro
storage period, and storage temperature

Nature 161 : 978

CHANG M. C. (1950)

Transplantation of rabbit blastocyst at
late stage: probability of normal develop-
ment and viability at low temperature

Science 111 : 544

CHANG M. C. und A. WALTON (1940)

The effects of low temperature and accli-
matization on the respiratory activity and
survival of ram spermatozoa

Proc. Roy. Soc., B, 129 : 517

DOEBBLER G. F. (1960)

Cryoprotective compounds. Review and dis-
cussion of structure and function

Cryobiology 3 : 2

DOUGHERTY R. M. (1962)

Use of dimethylsulfoxide for preservation
of tissue culture cells by freezing

Nature 193 : 550

DULBECCO R. und M. VOGT (1954)

Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses

J. exp. Med. 99 : 167

EDWARDS R. G. und A. H. GATES (1959)

Timing of the stages of maturation, divisions, ovulation, fertilization and the first cleavage of eggs of adult mice treated with gonadotrophins

J. Endocrin. 18 : 292

ELLIOTT D. S., BURFENING P. J. und L. C. ULBERG (1968)

Subsequent development during incubation of fertilized mouse ova stressed by high ambient temperatures

J. exp. Zool. 169 : 481

ELLIOTT D. S. und L. C. ULBERG (1971)

Early embryo development in the mammal.

I. Effects of experimental alterations during the first cell division in the mouse zygote

J. anim. Sci. 33 : 86

FARRANT J. (1965)

Mechanism of cell damage during freezing and thawing and its prevention

Nature 205 : 1284

FARRANT J. (1969)

Is there a common mechanism of protection of living cells by polyvinyl-pyrrolidone and glycerol during freezing?

Nature 222 : 1175

FERDOWS M., MOORE C. L. und A. E. DRACY (1958)

Survival of rabbit ova stored at -79°C

J. Dairy Sci. 41 : 739

FOWLER R. E. und R. G. EDWARDS (1957)

Induction of superovulation and pregnancy
in mature mice by gonadotrophins

J. Endocrin. 15 : 374

GATES A. H. (1956)

Viability and developmental capacity of
eggs from immature mice treated with gona-
dotrophins

Nature 177 : 754

GATES A. H. (1965)

Rate of ovular development as a factor in
embryonic survival

In: Preimplantation stages of pregnancy
Ciba Foundation Symposium

Eds.: G. E. W. WOLSTENHOLME und M. O'CONNOR

GELDERMANN H., STRANZINGER G. und S. PAUFLER (1970)

Automatisierung der Chromosomenanalyse mit
dem Elektronenrechner

Humangenetik 9 : 325

GOSDON R. G. (1974)

Survival of transferred C 57 B1 mouse
embryos: Effect of age of donor and
recipient

Fert. Steril. 25 : 348

- GROPP A., TETTENBORN U. und E. VON LEHMANN (1969)
 Chromosomenuntersuchungen bei der Tabakmaus
 (*M. poschiavinus*) und bei Tabakmaus-Hybriden
 Experientia 25 : 875
- HAMMOND J. (1949)
 Recovery and culture of tubal mouse ova
 Nature 163 : 28
- HAMPEL K. E. und A. LEVAN (1964)
 Breakage in human chromosoms induced by low
 temperature
 Hereditas 51 : 315
- HAYDN R. (1968)
 Die Temperatur bei der Adaption vor der
 Tiefgefrierung von Bullenspermien
 Vet. med. Diss. München
- HOFFMANN R. (1967)
 Methodik und Theorie der Chromosomenanalyse
 beim Haustier. Zugleich ein Beitrag zur Er-
 klärung der Zwickenbildung
 Vet. med. Diss. München
- HSU T. C. und C. M. POMERAT (1953)
 A method for spreading the chromosomes of
 cells in tissue culture
 J. Hered. 44 : 23
- IWAMATSU T. und M. C. CHANG (1971)
 Factor involved in the fertilization of
 mouse eggs in vitro
 J. Reprod. Fert. 26 : 197

JUNG S. (195)

Zucht und Haltung der wichtigsten Laboratoriumsversuchstiere

VEB Gustav Fischer Verlag, Jena

KARDYMOWICZ M., KARDYMOWICZ O., KUHL W. und A. LADA (1963)
Storage of fertilized sheep ova at low temperature

Acta biolog. Cracow., Ser. Zool. 6 : 31

KELLY E. P. (1971)

An examination of ovulation ratio in naturally ovulating and induced inbred and outbred mice

J. Reprod. Fert. 26 : 271

LEIBO S. P., FARRANT J., MAZUR P., HANNA jr. M. G. und L. H. SMITH (1970)

Effects of freezing on marrow stem cell suspension: Interactions of cooling and warming rates in the presence of PVP, sucrose, or glycerol

Cryobiology 6 : 315

LEVINE R. P. (1966)

Genetik

BLV, Bayerischer Landwirtschaftsverlag GmbH, München, Basel, Wien

LOVELOCK J. E. (1954a)

Physical instability and thermal shock in red cells

Nature 173 : 659

LOVELOCK J. E. (1954b)

The protective action of neutral solutes
against haemolysis by freezing and
thawing

Biochem. J. 56 : 265

LOVELOCK J. E. und M. W. H. BISHOP (1959)

Prevention of freezing damage to living
cells by dimethylsulfoxide

Nature 183 : 1394

MAURER R., GELDERMANN H., STRANZINGER G. und S. PAUF-
LER (1974)

Untersuchungen chromosomaler Aberra-
tionen an Blastozysten nach Tiefgefrie-
rung des zur Besamung verwendeten Sper-
mas beim Kaninchen

Zuchthygenie 9 : 122

MAUSS J., RAUSCH-STROOMANN J. G., HALM E., PETRY R.
und Z. ZAMBAL (1970)

Gewinnung, histologische Untersuchungen und
Lösungsversuche des Ejakulatspfropfes der
Ratte

Andrologie 2 : 13

MAZUR P. (1963)

Kinetics of water loss from cells at sub-
zero temperatures and the likelihood of
intracellular freezing

J. gen. Physiol. 47 : 347

MAZUR P. (1966)

Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells

Cryobiology 2 : 181

MAZUR P., FARRANT J., LEIBO S. P. und E. H. Y. CHU (1969)

Survival of hamster tissue culture cells after freezing and thawing

Cryobiology 6 : 1

MAZUR P. (1970)

The freezing of biological systems

Scienc 168 : 939

MCFEELY R. A. (1966)

A direct method for the display of chromosomes from early pig embryos

J. Reprod. Fert. 11 : 161

MCLAREN A. und D. MICHIE (1956)

Studies on the transfer of fertilized mouse eggs to uterine foster-mothers.

I. Factors affecting implantation and survival of native and transferred eggs

J. exp. Biol. 33 : 394

MCLAREN A. und D. MICHIE (1959)

Studies on the transfer of fertilized mouse eggs to uterine foster-mothers.

II. The effect of transferring large numbers of eggs

J. exp. Biol. 36 : 40

- MCLAREN A. (1972)
Late labelling as an aid to chromosomal
sexing of cultured mouse blood cells
Cytogenetics 11 : 35
- MERYMAN H. T. (1956)
Mechanics of freezing in living cells and
tissues
Science 124 : 515
- MERYMAN H. T. (1968)
Modified model for mechanism of freezing
injury in erythrocytes
Nature 218 : 333
- MILOVANOV V. K. (1934)
Osnovy Iskusstvennogo Oseminija
(Principles of artificial insemination)
Iskustvennoe osemenenie s.-h.
Zivotnyh, Moscow
Zitat nach CHANG und WALTEN, 1940
- OLSSON M. und Y. MELANDER (1966)
Chromosomal changes in rabbit cell-
lines after storage at low tempera-
ture
Hereditas 56 : 367
- ORSINI M. W. und A. MCLAREN (1967)
Loss of the Zona pellucida in mice, and
the effect of tubal ligation and ovari-
ectomy
J. Reprod. Fert. 13 : 485

PAN THE TRAN und M. A. BENDER (1960)

Protection of mouse bone marrow by inorganic compounds during freezing and thawing

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 104 : 386

PERSIDSKY M. und V. RICHARDS (1963)

Optimal conditions and comparative effectiveness of dimethyl sulfoxide and polyvinyl-pyrrolidone in preservation of bone marrow

Nature 197 : 1010

POLGE C., SMITH A. U. und A. S. PARKES (1949)

Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures

Nature 164 : 666

RAFFERTY jr. K. A. (1970)

Methods in experimental embryology of the mouse

The Johns Hopkins Press, Baltimore and London

RASMUSSEN D. H. und A. P. MACKENZIE (1968)

Phase diagram for the system water-dimethylsulfoxide

Nature 220 : 1315

RUGH R. (1968)

The mouse. Its reproduction and development
Burgess Publishing Company, Minneapolis

RUNNER M. N. (1951)

Differentiation of intrinsic and maternal factors governing intrauterine survival of mammalian young

J. exp. Zool. 116 : 1

RUNNER M. N. und J. PALM (1953)

Transplantation and survival of unfertilized ova in the mouse in relation to post-ovulatory age

J. exp. Zool. 124 : 303

SALISBURY G. W. und N. L. VAN DEMARK (1961)

Principles and techniques of spermatozoan preservation

In: Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle

W. H. Freeman a. Company, San Francisco and London

SCHNEIDER U., HAHN J. und H. SULZER (1974)

Erste Ergebnisse der Tiefgefrierkonservierung von Mäuse- und Kanincheneizellen

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 81 : 445

SHERMAN J. K. und T. P. LIN (1958a)

Effect of glycerol and low temperature on survival of unfertilized mouse eggs

Nature 181 : 785

SHERMAN J. K. und T. P. LIN (1958b)

Survival of unfertilized mouse eggs during freezing and thawing

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 98 : 902

- SHERMAN J. K. und T. P. LIN (1959)
Temperature shock and cold-storage of unfertilized mouse eggs
Fert. Steril. 10 : 384
- SHERMAN J. K. (1963)
Questionable protection by intracellular glycerol during freezing and thawing
J. cell. Comp. Physiol. 61 : 67
- SHERMAN J. K. (1964)
Low temperature research on spermatozoa and eggs
Cryobiology 1 : 103
- SIMMONS M. L. und J. O. BRICK (1970)
The laboratory mouse. Selection and management
Prentice-Hall, Inc.; Englewood Cliffs;
New Jersey
- SMITH A. U. (1952)
Behaviour of fertilized rabbit eggs exposed to glycerol and low temperatures
Nature 170 : 374
- STRANZINGER G., GELDERMANN H. und S. PAUFLER (1970)
Eine halbautomatische Chromosomenmeßmethode mit dem Koordinatenmeßtisch "Pencil Follower"
Humangenetik 10 : 44
- TARKOWSKI A. K. (1959)
Experiments on the transplantation of ova in mice
Acta Theriologica 2 : 251

TARKOWSKI A. K. (1966)

An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs

Cytogenetics 5 : 394

TERVIT H. R. und L. E. A. ROWSON (1974)

Birth of lambs after culture of sheep ova in vitro for up to 6 days

J. Reprod. Fert. 38 : 177

TIJO J. H. und A. LEVAN (1956)

The chromosome number of the man

Hereditas 42 : 1

WALES R. G. und J. D. BIGGERS (1968)

The permeability of two- and eight-cell mouse embryos to L-malic acid

J. Reprod. Fert. 15 : 103

WALES R. G. und D. G. WHITTINGHAM (1971)

Decomposition of sodium pyruvate in culture media stored at 5° C and its effects on the development of preimplantation mouse embryos

J. Reprod. Fert. 24 : 126

WHITTEN W. K. (1956)

Culture of tubal mouse ova

Nature 177 : 96

WHITTEN W. K. und J. D. BIGGERS (1968)

Complete development in vitro of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium

J. Reprod. Fert. 17 : 399

WHITTINGHAM D. G. (1968)

Fertilization of mouse eggs in vitro

Nature 220 : 592

WHITTINGHAM D. G. (1971a)

Survival of mouse embryos after freezing
and thawing

Nature 233 : 125

WHITTINGHAM D. G. (1971b)

Culture of mouse ova

J. Reprod. Fert., Suppl. 14 : 7

WHITTINGHAM D. G. (unveröffentlicht)

Zitat nach WHITTINGHAM D. G. (1971a)

WHITTINGHAM D. G. und J. D. BIGGERS (1967)

Fallopian tube and early cleavage in the
mouse

Nature 213 : 942

WHITTINGHAM D. G., LEIBO S. P. und P. MAZUR (1972)

Survival of mouse embryos frozen to
- 196° C and - 269° C

Science 178 : 411

WHITTINGHAM D. G. und R. G. WALES (1969)

Storage of two-cell mouse embryos in vitro

Austr. J. biol. Sci. 22 : 1065

WHITTINGHAM D. G. und R. G. WALES (unveröffentlicht)

Zitat nach WHITTINGHAM D. G. (1971b)

WHITTINGHAM D. G. und W. K. WHITTEN (1974)

Long term storage and aerial transport of
frozen mouse embryos

J. Reprod. Fert. 36 : 433

WILMUT J. (1972)

The effect of cooling rate, warming rate,
cryoprotective agent and stage of develop-
ment on survival of mouse embryos during
freezing and thawing

Life Sciences 11 : 1071

WILMUT J. und L. E. A. ROWSON (1973)

The successful low temperature preservation
of mouse and cow embryos

J. Reprod. Fert. 33 : 352

WROBLEWSKA J. (1969)

Chromosome preparations from mouse embryos
during early organo-genesis: Dissociation
after fixation, followed by air drying

Stain Technology 44 : 147

Für die Überlassung des Themas und die zu jeder Zeit gewährte Unterstützung möchte ich Herrn Prof. Dr. W. L e i d l herzlich danken.

Den Angehörigen der Abteilung für Andrologie und Künstliche Besamung Dr. W. S c h e f e l s, Dr. R. S t o l l a und Frau R. H a i t c h i, die mir in allen Belangen hilfreich entgegenkamen, sage ich aufrichtigen Dank.

Weiterhin schulde ich Herrn Prof. Dr. A. G r o p p und Frau D. G i e r s am Institut für Pathologie der Medizinischen Hochschule Lübeck für die Einarbeitung in das Gebiet der Chromosomendarstellung Dank.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. G. S t r a n z i n g e r am Institut für Tierzucht in Weihenstephan für seine Ratschläge zur Durchführung der Tiefgefrierkonservierung und Chromosomenauswertung.

Lebenslauf

Am 10. Juli 1944 wurde ich als Sohn des Juristen Albert Kuhn und seiner Ehefrau Thea, geb. Hardt in Remscheid geboren. Nach vierjährigem Besuch der Volksschule bestand ich 1955 die Aufnahmeprüfung am Städtischen Naturwissenschaftlichen Gymnasium zu Remscheid und legte dort im Frühjahr 1965 die Reifeprüfung ab. Nach Beendigung des Wehrdienstes begann ich im Herbst 1967 das Studium der Tiermedizin an der Universität München. Im Oktober 1972 schloß ich mein Studium mit der tierärztlichen Prüfung ab und erhielt im gleichen Jahr die Bestallung als Tierarzt.

Seit dem 15. November 1972 war ich mit der vorliegenden Arbeit beschäftigt.

